FUNDAMENTUM

VICTORIA HERLEA

MICROBIOLOGIE GENERALĂ



Apariția acestei cărți, utilă în primul rând studenților Facultăților de Biologie și Chimie ale Universității din București, ca și celor de la Universitatea Politehnica București, care își realizează pregătirea în domeniul Microbiologiei la Facultatea de Biologie, reprezintă rezultatul eforturilor conjugate din partea mai multor persoane implicate în: editare, producție, analiză ca referenți științifici, cărora le adresez alese mulțumiri.

Pentru suportul moral și ajutorul concret acordat în perioada dificilă și de lungă durată a redactării finale a manuscrisului, definitivării figurilor și tabelelor, corecturii (efectuate la calculator conform cerințelor Editurii) se cuvine ***o mențiune specială*** colaboratoarelor mele, îndeosebi D-nei Doina Bulai și D-nei Veronica Lazăr, cărora le sunt profund recunoscătoare.

Autoarea

CUPRINS

PREFAȚA

Apariția unui manual de Microbiologie generală este un eveniment important, ținând seama de dinamismul acesteia și de implicațiile sale profunde în diferite alte domenii ale științelor biologice.

După cum este știut, Biologia reprezintă singurul domeniu al științei, care în ultimele decenii a fost obiectul a două revoluții științifice - revoluția biologiei moleculare și cea biotehnologică sau bioindustrială și, în ambele, microorganismele au jucat un rol esențial.

Ele au transformat radical modul de gândire asupra lumii vii, determinând nu numai o extraordinară acumulare de fapte noi, ci și o restructurare a conceptelor biologice referitoare la fenomenele fundamentale ale vieții, având în plus și o implicare imprevizibilă în rezolvarea unor probleme de importanță economică și socială.

Aceasta demonstrează că științele microbiologice ca discipline fundamentale pentru învățământul biologic universitar depășesc limitele de interes strict ale domeniului, furnizând un ansamblu de cunoștințe absolut esențiale oricărui biolog, pentru înțelegerea particularităților și performanțelor sistemelor biologice.

Lucrarea de față prezintă într-o formă sintetică și clară principalele probleme legate de structura și arhitectura moleculară a bacteriilor, metabolismul, creșterea și multiplicarea, genetica, poziția lor în lumea vie etc. precum și date privind structura moleculară, cultivarea, replicarea, genetică și relațiile virusurilor cu celulele-gazdă.

*Ne exprimăm speranța, că lucrarea de față, bazată pe cele mai noi date din literatura de specialitate, elaborată de D-na **prof. dr. Victoria Herlea**, cadru didactic cu o bogată experiență didactică, va fi primită cu interes, nu numai de studenții biologi și biochimiști, ci și de orice biolog dornic să se informeze asupra problemelor actuale ale acestui domeniu atât de important al științelor biologice.*

Academician, prof. dr. docent G. ZARNEA
Președintele Secției de Științe biologice
a Academiei Române

INTRODUCERE
ÎN STUDIUL MICROBIOLOGIEI

Definirea și spațiul domeniului

Microbiologia este un domeniu specializat al Biologiei care studiază organisme invizibile, ca indivizi, ochiului liber. Asemenea organisme, cu dimensiuni microscopice sunt numite **microorganisme**, *microbi* sau cu alți termeni, în funcție de context. De exemplu, termenul de *germeni,* larg utilizat, se referă la rolul lor în infecție și boală, accentuând nejustificat reputația dezagreabilă a microorganismelor și având de fapt un alt sens biologic. Termenul de *microb*, creat de medicul francez Sédillot în 1878, este incorect din punct de vedere științific, deoarece etimologic înseamnă *viață scurtă* și nu *dimensiuni mici*. Această denumire s-a păstrat însă, ea fiind adoptată și de L. Pasteur, astfel încât știința având ca obiect studiul microbilor a rămas cu numele de **Microbiologie**. În prezent, în lumea științifică se folosește denumirea corectă de **microorganism**. Alți termeni pe care îi întâlnim în studiu sunt: *bacterii, fungi, protozoare, alge și virusuri*, aceștia referindu-se de fapt la grupele majore pe care microbiologii le studiază și care reflectă diversitatea lumii microbiene (Fig.1).

Natura microorganismelor le face subiecte ideale de studiu, adesea mai atractive decât organismele macroscopice. Printre atributele lor se remarcă relativa simplitate, reproducerea rapidă și adaptabilitatea (capacitatea de modificare a structurii sau funcției cu scopul ajustării la mediu).

Microbiologia este una din cele mai extinse și complexe științe biologice, deoarece pe lângă studiul istoriei naturale a microorganismelor are în vedere fiecare aspect al interacțiunii microorganism - organism uman, microorganism - mediu, incluzând astfel aspecte legate de infecție și boală, terapie medicamentoasă, imunologie, inginerie genetică, industrie, agricultură și ecologie.

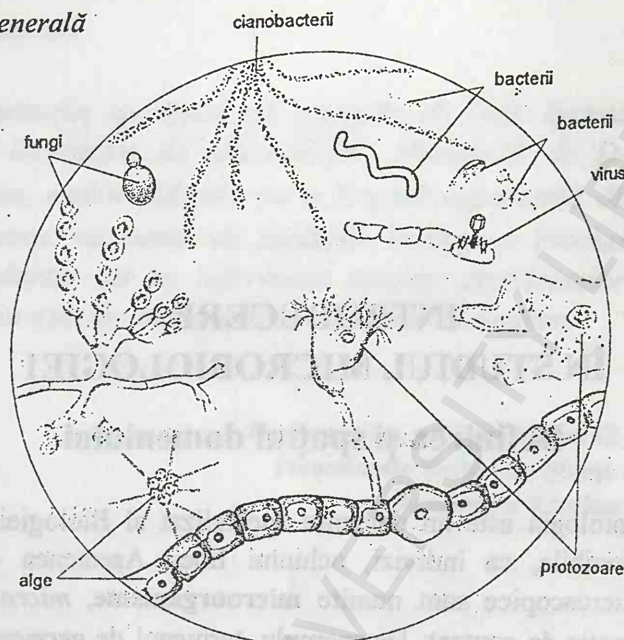


Fig. 1. Diversitatea lumii microorganismelor.

Principalele ramuri subordonate care se află sub „umbrela" mare și în extindere a Microbiologiei sunt trecute în Tabelul 1. De fapt, în prezent se poate vorbi de o serie de științe microbiologice, cu statut aparte, având preocupări specifice și utilizând o terminologie corespunzătoare.

Tabelul nr. 1

Ramurile Microbiologiei

Denumirea Științei	Domeniul de studiu
1	2
Bacteriologie	Bacterii - Cele mai simple și cele mai mici organisme unicelulare.
Micologie	Fungi - grup de organisme care include atât forme microscopice (drojdii și mucegaiuri), cât și forme macroscopice.
Protozoologie	Protozoare - organisme în cea mai mare parte unicelulare, asemănătoare animalelor („*animal- like*")
Virologie	Virusuri - particule acelulare foarte mici care parazitează organismele vii.
Parazitologie	Parazitism și organisme parazite - tradițional include protozoare patogene, viermi (din categoria Helminthes) și anumite insecte.
Ficologie sau algologie	Organisme acvatice simple numite alge, de la forme unicelulare la forme mari (algele marine).

(*Continuare tabelul nr. 1*)

Morfologia (anatomia) microorganismelor	Structura detaliată a microorganismelor.
Fiziologia microorganismelor	Funcția microbiană (metabolism) la nivel celular și molecular.
Taxonomia microorganismelor	Clasificarea, nomenclatura și identificarea microorganismelor.
Genetica microorganismelor, biologia moleculară	Funcția materialului genetic și reacțiile biochimice ale celulelor, implicate în metabolism și creștere.
Ecologia microorganismelor	Interrelații între organisme și mediu; rolul microorganismelor în circuitele nutrienților din sol, apă și alte comunități naturale.

La aceste discipline microbiologice se adaugă *domeniile aplicative* ale Microbiologiei, de un considerabil interes, conturate unele încă de mult timp sau altele relativ recent. Dintre acestea:

Imunologia - studiază sistemul mecanismelor de apărare ale organismelor, care le protejează față de infecție și/sau de orice substanță străină (*non-self*) care pătrunde în interiorul acestora. Știința include serologia, o disciplină consacrată testării produșilor reacțiilor imune în serul sanguin și are ca scop prin aceste mijloace diagnosticul bolilor infecțioase și alergologia, studiul reacțiilor (răspunsurilor) alergice sau de hipersensibilitate față de compuși în mod obișnuit nevătămători. Pe lângă aceste discipline, Imunologia include în prezent încă multe altele, datorită progreselor realizate în studiul (inclusiv la nivel molecular) mecanismelor prin care organismele au capacitatea de a distinge între *self* (propriu) și *non-self*, cu rezultat beneficial sau detrimental pentru organism.

Microbiologia sănătății publice și epidemiologie - are ca scop monitorizarea și controlul răspândirii bolilor în comunități.

Microbiologia alimentelor, a produselor lactate și a apei - examinează rolul microorganismelor, atât beneficial cât și detrimental în alimente și băuturile consumabile.

Microbiologia solului - studiază ansamblul microorganismelor prezente în sol, interrelațiile dintre acestea și între microorganisme și plante; rolul microorganismelor în fertilitatea solului și în circuitul elementelor biogene în natură.

Microbiologia agricolă - este consacrată relațiilor dintre microor și recolte, cu accent pe îmbunătățirea producției și combaterea bolilor infecțioase.

Geomicrobiologia - studiază rolul microorganismelor în geneza diferitelor zăcăminte minerale și posibilitatea folosirii microorganismelor pentru utilizarea metalelor din zăcămintele sărace.

Microbiologia petrolului - studiază rolul microorganismelor în geneza zăcămintelor de petrol, utilizarea microorganismelor în extracții și pentru depistarea zăcămintelor de petrol, acțiunea de biodegradare microbiană.

Microbiologia mediului - sector foarte specializat al Microbiologiei, care are ca obiect studiul microorganismelor prezente în mod obișnuit în ape, sol, aer și se ocupă de soluționarea problemelor practice din domeniul sanitar (evacuarea deșeurilor, soluții practice pentru instalații sanitare, etc.). Are în vedere în special studiul microorganismelor responsabile de gustul și mirosul neplăcut al apei, colmatarea fântânilor, fenomenele de coroziune a conductelor, etc.

Biotehnologia - include orice proces prin care oamenii utilizează sisteme (organisme) sau procese biologice pentru obținerea unui produs dorit, de la fabricarea pâinii la terapia genică. Majoritatea sistemelor biotehnologice implică acțiunea bacteriilor, drojdiilor, mucegaiurilor și algelor, care au fost selectate sau modificate pentru a sintetiza anumiți compuși de interes.

Microbiologia industrială - are în vedere utilizarea microorganismelor pentru a produce sau recolta cantități mari de compuși utili și necesari ca: vitamine, aminoacizi, solvenți, medicamente și enzime.

Ingineria genetică și tehnologia ADN recombinant - implică tehnici care în mod deliberat alterează fondul genetic al organismelor pentru a induce obținerea de noi compuși, combinații genetice diferite și chiar organisme unice. Acesta poate fi considerat cel mai puternic și dinamic domeniu al microbiologiei moderne.

După cum se poate constata din această enumerare (care nu este exhaustivă), unele dintre domenii se intersectează sau au evoluat în altele. De exemplu, preocupările Microbiologiei industriale axate pe utilizarea comercială a microorganismelor pentru producerea unor alimente și compuși chimici s-au extins în alte două zone care merită o considerabilă atenție: proteina monocelulară („single-cell protein" = S.C.P.), un substitut alimentar făcut din microoganisme și ingineria genetică, o nouă tehnologie care mărește mult potențialul bacteriilor ca fabrici biochimice miniaturale.

În același timp, fiecare dintre disciplinele majore ale Microbiologiei conține numeroase subdiviziuni sau specialități care la rândul lor se preocupă de domenii specifice. De fapt, numeroasele domenii ale acestei științe au devenit atât de specializate încât nu este neobișnuit pentru un microbiolog să-și petreacă întreaga viață concentrându-se pe un singur grup sau tip de microorganisme, proces biochimic sau boală. Pe de altă parte, există rareori un microbiolog strict specializat. De exemplu, există specialiști în fiziologie bacteriană care studiază procesele industriale, specialiști în biologie moleculară care se centrează pe genetica virusurilor, taxonomiști de fungi care sunt interesați în acțiunea pesticidelor utilizate în agricultură, stomatologi care se specializează în microbiologia cavității bucale, etc. Aceasta se datorează multiplicării necontenite a rezultatelor cercetării în domeniul Microbiologiei, care au dus la acumularea unui material extrem de bogat faptic și la cristalizarea unor concepții noi.

Cercetările de microbiologie au condus la înțelegerea mai profundă a numeroase principii teoretice din Biologie. De exemplu, studiul microorganismelor a stabilit conceptele universale referitoare la chimia vieții; sistemele de ereditate și circuitele globale ale nutrienților, mineralelor și gazelor. Descoperiri ale cercetării fundamentale microbiologice s-au dovedit a conduce ulterior, fie și accidental, la unele noi medicamente, mijloace terapeutice, alimente sau procese industriale.

Microorganismele, prin reprezentanți remarcabili ai diferitelor grupe, constituie sisteme model pentru descifrarea proprietăților universale ale celulelor la nivel molecular și a unor mecanisme funcționale în celula eucariotă, inclusiv umană. Utilizarea microorganismelor ca celule model în studiile de genetică moleculară și fiziologie celulară permite extrapolări la nivelul organismelor superioare, existând realizări și perspective de aplicabilitate a principiilor și abordărilor de succes în asemenea cerceţări, la studiul celulelor umane care în prezent pot fi cultivate asemănător bacteriilor.

Cadrul larg al Microbiologiei moderne, contribuția sa imensă la dezvoltarea altor ramuri ale Biologiei și implicațiile ei largi teoretice și practice în evoluția altor științe determinate de posibilitatea utilizării microorganismelor ca model experimental fac ca însușirea principiilor fundamentale ale Microbiologiei să fie de o necesitate absolută pentru biolog, ca și pentru biochimist și biofizician, genetician, medic, agronom, cercetător în industria fermentativă, etc.

Natura și importanța microorganismelor

Definirea termenului de microorganism. Principalele grupe de microorganisme

În concepția modernă, integratoare, lumea microorganismelor este prezentată ca o entitate caracterizată printr-o serie de particularități generale: ◆ dimensiuni foarte mici; ◆ organizare celulară; ◆ particularități legate de viață care le caracterizează ca fiind sisteme biologice; ◆ raport mare între suprafață și volum, ceea ce favorizează strategia de supraviețuire, schimburile bilaterale rapide organism - mediu și o capacitate mare de multiplicare. Însumând aceste proprietăți definim un organism ca fiind **microorganism**, fără ca termenul să aibă vreo implicație de ordin taxonomic, deci indiferent de poziția sa în sistemul de clasificare a lumii vii și indiferent de diversitatea sa extrem de mare.

Referindu-ne la **organizarea celulară**, drept caracter general al microorganismelor, trebuie să precizăm încadrarea microorganismelor în cele două tipuri de celule apărute în cursul istoriei evolutive și numite procariote și eucariote (<karion> = nucleu; <pro> = înainte, primordial; <eu> = adevărat, normal). Între cele două tipuri există o diferență primordială în ceea ce privește complexitatea structurii celulare. La modul cel mai general, celulele procariote sunt lipsite de un nucleu propriu-zis, în timp ce cele eucariote îl prezintă. Organismele alcătuite din asemenea celule sunt numite respectiv procariote **(Procaryotes)** și eucariote **(Eucaryotes)**. Toate procariotele sunt microorganisme, în timp ce dintre eucariote, numai unele sunt microorganisme.

Majoritatea microorganismelor au un corp alcătuit dintr-o singură celulă (organisme unicelulare) sau numai din câteva celule. În aparenta ei simplitate, lumea microorganismelor este la fel de complexă și diversă ca cea macroscopică; de fapt, ca număr, microorganismele depășesc cu un factor de câteva mii, organismele macroscopice.

Referindu-ne la **dimensiunile microscopice**, drept caracter general al microorganismelor este necesar de asemenea să precizăm ce fel de dimensiuni avem în vedere. Această precizare poate fi cel mai bine evidențiată prin

compararea grupelor de microorganisme cu organisme mai mari ale lumii macroscopice și cu moleculele și atomii lumii moleculare (Fig. 2). În timp ce dimensiunile lumii macroscopice sunt date în cm. și m., cele ale majorității microorganismelor și virusurilor intră în spectrul micrometrilor (µm) și într-o măsură mai mică a nanometrilor (nm) și milimetrilor (mm).

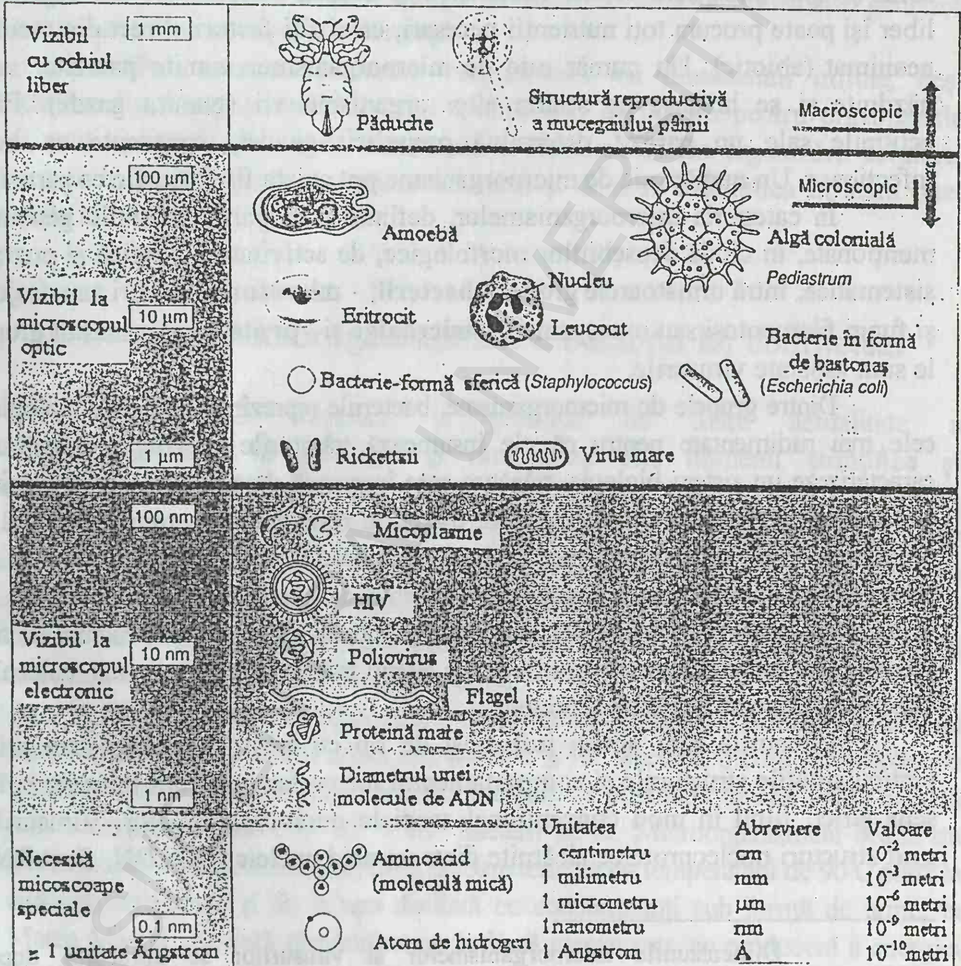


Fig. 2. Unitățile de măsură utilizate pentru dimensiunile microorganismelor și virusurilor, cu o reprezentare comparativă a nivelelor: macroscopic, microscopic, molecular și atomic.

Spectrul de dimensiuni[1] al majorității microorganismelor se extinde de la cele mai mici virusuri (asociate convențional microorganismelor) care măsoară aproximativ 20 nm și de fapt nu sunt mult mai mari decât o moleculă mare, până la protozoare care măsoară 3-4 mm și sunt vizibile ochiului liber.

În ceea ce privește **stilul de viață** al microorganismelor, este de precizat la modul general că majoritatea microorganismelor trăiesc liber în habitate ca solul și apa, unde sunt relativ inofensive și adesea beneficiale. Un organism liber își poate procura toți nutrienții necesari, ca și alți factori, direct din mediul neanimat (abiotic). Un număr mic de microorganisme, numite parazite, sunt găzduite și se hrănesc pe seama altor organisme vii (numite gazde). Prin acțiunile sale un parazit determină prejudicii gazdei, cunoscute ca boli infecțioase. Un număr mic de microorganisme pot exista fie liber, fie ca paraziți.

În categoria microorganismelor, definite prin particularitățile generale menționate, în ciuda deosebirilor morfologice, de activitate biologică și poziție sistematică, intră următoarele grupe: - **bacterii**; - **microfungi** (levuri sau drojdii și fungi filamentoși sau mucegaiuri); - **microalge** și - **protozoare**. Acestor grupe le sunt asociate virusurile.

Dintre grupele de microorganisme, bacteriile reprezintă sistemele biologice cele mai rudimentare pentru că ele însumează trăsăturile minime care pot să caracterizeze un sistem biologic, trăsături care împreună determină ceea ce numim *viață*. După caracterizarea lui F. Jacob, bacteriile reprezintă un „minimum vital - organismele cele mai simple care reunesc atributele de organizare, autonomie și invarianță ce caracterizează ființele vii". Dincolo de lumea bacteriilor ajungem la structuri cu organizare moleculară, intrând în domeniul molecular al structurii de tip acelular care caracterizează virusurile și alți agenți infecțioși subvirali (sau molecule infecțioase) cum ar fi viroizii și prionii.

Virusurile sunt agenți infecțioși de tip cu totul particular, care prin particularitățile structurale și comportamentul lor nu fac parte din lumea vie, în sens strict, fiind în mod convențional asociate microorganismelor. Virusurile sunt structuri nucleoproteice alcătuite dintr-un acid nucleic (fie ADN, fie ARN)

---

[1] Dimensiunile microorganismelor și virusurilor se apreciază după sistemul metric actual (metru = unitatea standard de lungime) în µm, nm și Å. 1µm (anterior µ) = 1/1000000 = 0,000001 m = 10^{-6} m; 1 nm (anterior mµ) = =1/1000000000 = 0,000000001 m = 10^{-9} m; 1 Å = 0,0000000001 m = 10^{-10} m.

și proteine. Deci, față de tipul de organizare celulară proprie la nivel rudimentar microorganismelor, virusurile reprezintă o treaptă inferioară, corespunzând unor complexe macromoleculare mai mult sau mai puțin complicate. La acest nivel activitățile metabolice au dispărut, ca și echivalenții enzimatici. Agenții infecțioși nu se mai multiplică, ci sunt multiplicați de celulele gazdă pe care le parazitează. Cu excepția prionilor, ei poartă informație genetică pe care o introduc într-o celulă vie și o obligă să utilizeze această informație genetică pentru a produce noi agenți infecțioși.

Astfel, virusurile, entități corpusculare cu dimensiuni infime, deși alcătuite din componentele chimice esențiale și definitorii pentru organismele vii sunt lipsite de atributele structurale și funcționale ale organizării celulare, ceea ce le face inapte de a exista autonom și de a se multiplica în afara unei celule vii.

Importanța microorganismelor. Caracterul lor conflictual.

Semnificația teoretică și practică de mare actualitate a microorganismelor în Biologie și numeroase alte domenii științifice și economico-industriale are ca premiză implicațiile lor în viața plantelor, animalelor și în primul rând a omului. Trăim într-o lume a microorganismelor de la naștere până la moarte. Suntem într-un permanent contact cu această lume aparte a cărei intervenție a schimbat și schimbă permanent viața noastră și fără de care existența pe pământ nu ar putea fi posibilă; o lume aseptică nu numai că n-ar fi de dorit, ci ar fi chiar neconfortabilă.

Microorganismele reprezintă o fracțiune substanțială a biomasei totale. Se estimează că fiecare individ uman este purtător a 10^{14} bacterii, o cifră care depășește numărul celulelor proprii (din care este alcătuit) și populația umană totală excretă prin intestinul său colectiv 10^{22} - 10^{23} bacterii pe zi. Microorganismele ocupă un număr enorm de nișe ecologice, de la izvoare termale cu temperatură de 90°C până la alimente refrigerate și de la apa distilată cu contaminanți sub formă de urme, la Marea Moartă. Această răspândire are la bază mecanisme de producere a energiei dintre care unele reprezintă o excepție unică.

Având în vedere această răspândire a microorganismelor, rolul paradoxal, atât ca inamici, cât și ca aliați ai vieții pe planeta noastră, pe care l-au

jucat și îl joacă microorganismele este în mod constant surprinzător. Impactul lor economico-social este deosebit datorită efectelor dăunătoare și beneficiale pe care le exercită.

Efectele dăunătoare sunt legate de intervenția microorganismelor și virusurilor ca agenți patogeni. De la primul studiu, realizat de R. Koch, acum aproximativ 110 ani, prin care o boală specifică (*anthrax*) este asociată în mod clar unui organism microscopic, microbiologii au realizat cercetări continue privind agenții cauzali ai bolilor. În ultimii 20 de ani au fost descoperiți noi agenți infecțioși ca HIV (*human immunodeficiency virus* = virusul imunodeficienței umane) și alte retrovirusuri, iar boli nou apărute ca boala Lyme și boala Legionarilor au fost asociate definitiv cu microorganisme. Conexiuni intrigante între microorganisme și boli de etiologie necunoscută continuă să fie făcute într-o asemenea măsură încât după aprecierea unor specialiști *toate bolile umane au o bază microbiană*. Mai recent s-a constatat existența unei corelații între diabetul de tip I și anumite virusuri *coxsakie*, între ulcerul gastric și o bacterie nouă care invadează stomacul și între artrita reumatoidă și infecții cu parvovirus. Deși implicarea precisă a agenților infecțioși în numeroase boli cronice rămâne de determinat, se deschid posibilități asupra unei întregi direcții de studiu și tratament potențial. În ciuda progreselor extraordinare în cunoașterea și tratarea bolilor infecțioase, lumea este încă devastată de ele. O.M.S. estimează că pe plan mondial, peste 20 de milioane de persoane mor în fiecare an de boli infecțioase ce pot fi prevenite. La acestea se adaugă nu numai boli *noi,* ca SIDA, ci și numeroase boli cunoscute de mult timp, ca tuberculoza, sifilisul, rujeola, care manifestă o dramatică reactualizare. Pentru a complica și mai mult problema, un număr tot mai mare de pacienți cu afecțiuni grave sunt menținuți în viață periode îndelungate de timp, fiind supuși unor infecții cu microorganisme comune din mediu, care nu afectează persoanele sănătoase. Citându-l pe Louis Pasteur, chiar cu o tehnologie medicală de excepție, *microbii* se pare că încă au *ultimul cuvânt*. Existența microorganismelor și virusurilor ca agenți patogeni, descoperită cu mult timp înainte, sau în zilele noastre, marchează domeniul Microbiologiei în special din punct de vedere practic, în sensul unui domeniu cu principii și tehnici de lucru aparte. Microbiologia furnizează tehnici și procedee pentru depistarea agenților care determină boli necunoscute sau altele care ar putea apare, metode pentru studiul acestor agenți,

ca și al microorganismelor în general, tehnici preluate de asemenea, parțial, în obținerea culturilor de celule vegetale și animale.

Pe lângă rolul implicat în amenințarea sănătății pe care îl au unele microorganisme, altele exercită efecte dăunătoare prin alterarea alimentelor sau altor produse comerciale. Adaptabilitatea și strategiile de supraviețuire ale microorganismelor sunt atât de bine dezvoltate încât ele ocupă cu ușurință și se dezvoltă chiar în noi habitate create prin diverse materiale de uz comercial cum ar fi: calculatoare, combustibil lichid (*jet fuel*), picturi, minerale, metal, plastic, hârtie și îmbrăcăminte.

Efecte beneficiale. Deși există tendința comună de a asocia microorganismele (bacteriile în special) cu bolile organismelor și cu alterările diferitelor produse sau materiale, numai un număr mic din totalul celor cunoscute este răspunzător de aceste efecte. În realitate, marea majoritate au contribuții esențiale la bunăstarea locuitorilor planetei noastre. Biosfera este întemeiată și susținută de lumea microorganismelor a cărei recunoștere se impune cu evidență pe măsură ce rasa umană supune la încercări echilibrul biosferei pământului prin creșterea celor *3P* (*population, power usage, pollution* = populație, folosirea resurselor energetice, poluare). După afirmația recentă a paleontologului Stephen Jay Gould: „*...Trăim în Era Bacteriilor așa cum a fost de la început, este acum și va fi mereu până la sfârșitul lumii*". Fără microorganisme viața macroscopică nu ar exista. Viața macroscopică este susținută de fixarea carbonului prin fotosinteză. Deși fotosinteza este atribuită în mod obișnuit plantelor, originea sa evolutivă se află în lumea bacteriilor. Plantele și-au dezvoltat capacitatea de fotosinteză numai în sensul de a fi achiziționat-o, prin acțiuni endosimbiotice cu (ciano)bacteriile. Astfel, principalul produs al fotosintezei, oxigenul atmosferic, își datorează existența în ultimă instanță bacteriilor. Capacitatea organismelor pluricelulare de a utiliza oxigen, care rezidă în mitocondrii, a fost de asemenea dobândită prin endosimbioză, implicând bacteriile purpurii. La toate nivelele bacteriile sunt fundamentale ecosistemului global, deoarece numai prin activitatea lor (reacții chimice complexe) materiile existente în cantități limitate pe pământ pot fi reciclate și reutilizate, asigurându-se viața. Microorganismele marine și de apă dulce formează baza lanțului trofic în oceane, râuri și lacuri. Cele din sol contribuie la degradarea resturilor vegetale și animale, încorporează azot molecular atmosferic în compuși organici, elementele chimice din sol și aer,

fiind astfel reciclate. Reciclarea globală se realizează pe baza metabolismului microbian. Rezervele de oxigen, balanța globală a altor gaze importante din atmosferă, ca dioxidul de carbon și metanul, sunt în mare măsură controlate prin metabolismul microbian. Chiar depunerea mineralelor este într-o oarecare măsură rezultatul activității bacteriilor. De aceea într-un sens fundamental biosfera este **bacteriosferă**.

În relația cu organismul uman și animal, microorganismele (bacteriile prezente în mod normal în intestin) asigură sinteza unor vitamine absolut necesare furnizând mecanisme naturale pentru asigurarea sănătății. Rolul microorganismelor în viața organismelor animale este cercetat cu ajutorul animalelor în stare de gnotobioză (gr. *viață cunoscută*). Utilizarea experimentală a animaleor axenice (*germ-free* = animale sterile bacteriologic) a arătat că microbiota normală, în special cea intestinală, poate exercita mai multe efecte beneficiale asupra organismului gazdă (în unele cazuri participă direct în digestie). Stabilirea efectului de protecție asupra organismului animal (inclusiv uman) exercitat de microbiota intestinală a dus la utilizarea așa numitelor **probiotice** sau suplimente alimentare de natură alimentară. Un probiotic este definit în prezent ca fiind un preparat constând din microorganisme vii sau stimulenți microbieni cu efect beneficial asupra microbiotei indigene a receptorului, care poate fi: animal, plantă sau aliment.

Microorganismele aduc numeroase beneficii de ordin comercial. În industrie sunt utilizate curent tehnici microbiologice pentru cultivarea microorganismelor în scopul utilizării lor la sinteza unor produși (acetonă, glicerină, acizi organici, enzime, alcooli, numeroase medicamente) mai ușor și mai ieftin decât prin sinteză chimică. Industria alimentară se bazează în mare parte pe microorganisme în realizarea unor etape esențiale din cadrul tehnologiei de prelucrare a alimentelor. Microorganismele sunt implicate în producerea oțetului, murăturilor, băuturilor alcoolice, produselor lactate, de panificație și a altora. Încă de la începuturile civilizației s-a observat că prin același proces unele alimente se alterează sau produc îmbolnăviri, în timp ce altele devin delicatese. În fiecare zonă în care este exploatată natura beneficială a microorganismelor au apărut progrese explozive. Sugestiv este exemplul bioremedierii: introducerea microorganismelor pentru a restaura stabilitatea în mediile poluate sau dezechilibrate. Este autorizată utilizarea tot mai mult a microorganismelor pentru a curăța petrolul sau îndepărta poluanții din lacuri și

surse de apă. Ne bazăm pe microorganisme care apar natural pentru degradarea materiilor *biodegradabile* din sol, ca și pentru epurarea apelor reziduale, purificarea mineralelor extrase și în general reciclarea nutrienților în toate ecosistemele planetei.

Cercetarea microorganismelor aliate omului reprezintă o preocupare esențială a ingineriei genetice, domeniu cu implicații pentru însăși fondul vieții. Unele din speranțele cele mai mari ale omenirii: vaccinul pentru AIDS (*aquired immune deficiency syndrome* = sindromul de imunodeficiență dobândită) provocat de HIV, plante autofertilizante, medicamente miraculoase, vindecarea de boli genetice, eliminarea poluării și soluții pentru nevoile de hrană ale omenirii, sunt dependente de acest domeniu.

Microorganismele sunt implicate astfel în viața noastră zilnică atât în sensul monden, cât și într-unul mult mai larg, de perspectivă. Este o realitate faptul că ne spălăm îmbrăcămintea cu detergenți care conțin enzime produse de microorganisme, mâncăm alimente a căror aromă derivă din acțiunea microorganismelor și în multe cazuri mâncăm chiar microorganisme. Ne vaccinăm cu preparate care conțin microorganisme modificate pentru a preveni boli (care sunt determinate de respectivele microorganisme într-o stare foarte asemănătoare); tratăm diferite afecțiuni clinice cu medicamente produse de microorganisme; pulverizăm plantele cu insecticide de origine microbiană și utilizăm microorganismele ca fabrici în miniatură pentru a obține diferite substanțe chimice industriale. În mod clar relația dintre oameni și microorganisme este complexă și nu putem decât să beneficiem de cunoștințele cât mai aprofundate asupra ei.

Absolvirea unui curs de Microbiologie implică însușirea unui punct de vedere modificat asupra lumii și a propriei persoane și o mai profundă înțelegere asupra rolurilor complexe pe care le au microorganismele în fiecare aspect al existenței.

Necesitatea denumirii microorganismelor în contextul taxonomiei

Sistemul formal privind organizarea, clasificarea și numirea viețuitoarelor este cunoscut sub denumirea de **taxonomie**. Taxonomia (considerată adesea sinonimă cu clasificarea) este definită de unii autori ca teoria

„clasificării". Această știință își are originile cu peste 250 de ani în urmă când Carl von Linné, un botanist suedez, a stabilit reguli fundamentale pentru categorii taxonomice sau **taxoni**. Von Linné a fost cel care și-a dat seama că existența unui sistem pentru recunoașterea și definirea proprietăților viețuitoarelor ar împiedica haosul în studiile științifice prin furnizarea unui nume unic fiecărui organism și a unei modalități exacte prin care acesta să fie catalogat. Clasificarea rezultată ar servi apoi ca mijloc pentru identificarea ulterioară a aceluiași organism și ar permite cercetătorilor din numeroasele domenii ale Biologiei să știe dacă ei discută despre același organism. Sistemul lui von Linné a servit cu succes la încadrarea în categorii a celor peste două milioane de tipuri diferite de organisme descoperite ulterior.

Scopurile majore ale taxonomiei sunt clasificarea, nomenclatura și identificarea. Aceste trei domenii sunt interrelate și joacă un rol vital în menținerea unui inventar dinamic al numeroaselor viețuitoare.

Clasificarea este aranjarea ordonată a organismelor în grupe, preferabil într-un sistem bazat pe relații evolutive.

Nomenclatura este procesul de desemnare a numelor pentru diferitele ranguri taxonomice ale fiecărei specii de microorganisme.

Identificarea este procesul de descoperire și înregistrare a trăsăturilor organismelor, astfel încât ele să poată fi plasate într-o schemă taxonomică globală. Cu alte cuvinte identificarea este modalitatea prin care organisme necunoscute sunt atribuite unor taxoni anterior descriși (prin compararea cu cele cunoscute).

Toți acești termeni se aplică în **sistematică**, ce reprezintă studiul diversității microorganismelor și al relațiilor dintre ele.

Nivele de clasificare

Taxonii principali într-o schemă de clasificare sunt organizați în 7 ranguri descendente, începând cu un **regn** (cel mai mare și cel mai general) și terminând cu o **specie** (cel mai mic și cel mai specific). Toți membrii unui regn au în comun numai una sau câteva caracteristici generale, în timp ce membrii unei specii au în comun majoritatea caracteristicilor lor, reprezentând toți același fel de organism. Între nivelul superior și cel inferior, cei cinci taxoni în ordine

descendentă sunt reprezentați de: **phylum** (pentru animale și protozoare) sau **diviziune** (pentru bacterii, fungi, alge și plante), **clasă, ordin, familie** și **gen.**

Deoarece schemele taxonomice sunt într-o măsură artificiale, anumite grupe de organisme nu se încadrează exact în cei 7 taxoni menționați. În asemenea cazuri, pot fi impuse nivele adiționale imediat superioare sau inferioare unui taxon formându-se asemenea categorii ca superfilum, subclasă. Pe lângă aceste categorii taxonomice, ierarhice, formale, pentru bacterii sunt utilizate *grupe informative* definite prin denumiri comune descriptive (vernaculare), care nu au o recunoaștere oficială în nomenclatură. De exemplu, bacteriile sulfat- și sulf-reducătoare prin dezasimilație, bacterii oxidante ale metanului, etc.

Bacteriile sunt studiate, cu rare excepții, nu ca indivizi, ci ca populații obținute în laborator sub formă de **culturi pure**. Culturile pure sunt analoge specimenelor de herbar din Botanică, fiind însă mult mai utile deoarece ele pot fi: ◆ menținute în stare viabilă; ◆ subcultivate; ◆ supuse indefinit testelor experimentale și ◆ transportate de la un laborator la altul.

La baza aranjării taxonilor se află, pe lângă criteriile morfologice (puțin relevante pentru bacterii), informația furnizată de cercetări de biochimie, fiziologie, biologie moleculară și genetică obținute obișnuit pe culturi pure.

Unitatea taxonomică fundamentală este **specia bacteriană** care este definită după alte criterii decât la organismele superioare. Specia are o importanță deosebită deoarece este singurul taxon care „există" în sens populațional în biosferă. Pentru bacterii nu există *granițe strict naturale ale speciilor, nici separare geografică.* Reproducerea este asexuată (clonală), fiecare individ dând naștere prin diviziuni succesive unei **clone** (un set de indivizi genetic identici, exceptând rare mutații). În plus, transferul rar de gene între organisme implică numai segmente mici de ADN fără formarea unui zigot propriu-zis. Demonstrarea structurii clonale a speciei face conceptul de specie mai puțin arbitrar.

Sub aspect practic specia bacteriană poate fi considerată ca o colecție de tulpini care au în comun numeroase trăsături și care diferă considerabil de alte tulpini. **Tulpina** reprezintă unitatea practică de lucru, fiind formată din descendenții unei singure izolări din mediu, în cultură pură, și în mod obișnuit este reprezentată dintr-o succesiune de culturi derivate dintr-o colonie unică

inițială. **Colonia** reprezintă o aglomerare macroscopică de celule care apare pe o zonă bine delimitată a suprafeței mediului de cultură solid și provine din multiplicarea unei singure celule. Una dintre tulpinile speciei este desemnată ca tulpină tip și servește ca tulpină purtătoare de nume pentru specie - specimenul de referință pentru nume. Pentru bacterii (ca și pentru unele alte microorganisme care sunt clasificate după proprietățile lor în cultură artificială) în loc de specimene tip sunt utilizate tulpini tip. Tulpinile tip ale speciilor sunt depozitate în așa numitele **colecții de culturi** (termenul mai adecvat ar fi „colecții de tulpini"). De aici ele pot fi obținute și utilizate ca tulpini de referință pentru compararea directă cu izolatele noi în vederea identificării lor corecte.

Acest concept practic al speciei implică un grad de subiectivitate reflectat în diversitatea fenotipică și genetică mai mare a unor specii bacteriene față de altele. De aceea, definirea speciei (specia genomică) pe baza unui grad particular de înrudire genetică (nivelul de homologie ADN manifestat în cadrul unui grup de tulpini) prezintă avantajele obiectivității și stabilității.

Genul bacterian este un grup taxonomic bine definit alcătuit din specii, în mod clar separate de alte genuri. Baza atribuirii taxonilor la nivelele de **familie** și **ordin** este chiar mai puțin sigură decât cea pentru nivelele de gen și specie. De aceea, mulți sistematicieni adoptă frecvent o categorisire *ad hoc*, provizorie, în care se aplică pentru grupe de bacterii nume pur descriptive (vernaculare).

Este de reținut faptul că toate ierarhiile taxonomice se bazează pe judecata oamenilor de știință cu o anumită experiență și competență privind un grup particular de organisme și că nu întotdeauna toți experții sunt de acord cu sistemul utilizat. În consecință, la orice nivel, nici un taxon nu este permanent. Taxonii sunt revizuiți în mod constant și prefecționați pe măsură ce devin disponibile noi informații sau devin prevalente noi puncte de vedere. Subliniind faptul că nici un sistem de clasificare nu a fost permanent sau universal acceptat, în Tabelul 2. prezentăm schema generală de clasificare a bacteriilor, adaptată din a 9-a ediție (1984 - 1989) a Manualului de Sistematică Bacteriană a lui Bergey, un manual de clasificare și descriere a bacteriilor, publicat continuu începând cu anul 1923. În această schemă bacteriile sunt clasificate în 4 diviziuni majore, într-o anume măsură diviziuni naturale, bazate pe natura peretelui celular.

Tabelul nr. 2

Grupe taxonomice majore de bacterii

Diviziunea I. Gracilicutes: Bacterii Gram- negative
Clasa I. Scotobacteria: bacterii nefotosintetizante.
Clasa II. Anoxyphotobacteria: bacterii fotosintetizante care nu produc oxigen (bacterii verzi și pupurii).
Clasa III. Oxyphotobacteria: bacterii fotosintetizante care produc oxigen (cianobacterii).
Calsa IV. Proteobacteria (bacterii purpurii și alte genuri)
Diviziunea II. Firmicutes: Bacterii Gram-pozitive
Clasa I. Firmibacteria: coci și/sau bacili
Clasa II. Thallobacteria: celule ramificate (actinomicete).
Diviziunea III. Tenericutes.
Clasa I. Mollicutes: bacterii lipsite de perete celular (micoplasme).
Diviziunea IV. Mendosicutes.*
Clasa I. Archaeobacteria: bacterii cu compuși atipici în peretele celular și membrane.

* Această diviziune este inclusă de unii autori într-un regn separat: Archaebacteria , iar în concepția filogeniei molecualre în domeniul Archaea (Fig. 4).

Desemnarea numelor speciilor

Pentru speciile de microorganisme se folosesc două feluri de denumiri, care trebuie bine diferențiate: numele științific, acceptat internațional și numele comun sau vernacular. Ca în cazul a numeroase organisme macroscopice, unele specii de microorganisme (în special patogene) sunt cunoscute după un nume comun, sugerat de anumite trăsături dominante. De exemplu: gonococ (*Neisseria gonorrhoeae*) sau bacilul leprei (*Mycobacterium leprae*). Adoptarea unor nume comune de tipul „coc mic galben" , ar conduce la o terminologie ce ar provoca numeroase încurcături. În plus, numele comune variază de la o regiune la alta, chiar în aceeași țară. Avantajul decisiv al nomenclaturii standardizate este furnizarea unui limbaj universal pentru schimbul de informații între oamenii de știință de pe întreg globul.

Pentru desemnarea numelui științific sau specific este utilizat **sistemul binominal** (cu două nume) al nomenclaturii. Numele științific este întotdeauna

o combinație a numelui generic (de gen) urmat de numele speciei (epitetul specific). Inițiala genului din numele științific este scrisă întotdeauna cu literă mare, iar a speciei cu literă mică. Ambele nume sunt scrise cu caractere italice (sau subliniate). Din motive de spațiu numele științific al genului poate fi dat și în formă prescurtată: inițiala urmată de punct sau în cazul în care două sau mai multe genuri au aceeași inițială cu două sau trei litere. Epitetul specific se scrie întotdeauna cu inițială mică și nu se prescurtează.

Pentru denumirile științifice se utilizează obișnuit limba latină sau greacă. În cazul utilizării altor limbi, numele vor fi latinizate. Strategia de asamblare a numelor speciei variază, dar în general, numele, aplicat pentru prima dată unei specii va fi numele său stabil. Numirea fiecărui organism nou descoperit este supervizată de un grup internațional de experți care face asigurarea că au fost urmate procedurile standard și că nu există deja un nume dat anterior organismului sau un alt organism cu același nume. Proveniența numelor este extrem de variată ca sursă de inspirație. Denumirea unui număr de specii a fost dată după numele unui microbiolog care a descoperit microorganismul respectiv sau a adus contribuții remarcabile în domeniu. Alte nume provin de la o particularitate a microorganismului (formă, culoare), locul unde poate fi găsit sau boala pe care o produce. Exemplificăm cu câteva nume specifice și originea lor:

- *Micrococcus luteus* - Gr. <micros> = mic; <kokkus> = bob; L. <luteus> = galben; „coc mic galben”
- *Pseudomonas tomato* - Gr. <pseudo = fals; <monas> = unitate; <tomato> = fruct. Deci o bacterie care infectează tomatele de grădină.
- *Corynebacterium pseudodiphtericum* - Gr. <coryne> = măciucă; <bacterium> = bastonaș mic; <pseudo> = fals; <diphtericus> = legat de boala difterie. „Bacterie falsă a difteriei în fomă de măciucă”.
- *Cryptococcus neoformans* - Gr. <cryptos> = ascuns; <kokkus> = bob; <neoforma> = formatoare de tumoră. „O bacterie care determină o infecție gravă a creierului”.
- *Lactobacillus sanfrancisco* - L. <lacto> = lapte; <bacillus> = bastonaș mic. „O specie de bacterie utilizată în asociere cu o drojdie (*Saccharomyces exiguus*) pentru fabricarea pâinii „acre”, o specialitate din California (San Francisco)”.

- *Vampirovibrio chlorellavorus* - Fr. <vampire> = vampir; L. <vibrio> = celulă mică curbată; <Chlorella> = un gen de algă verde; <vorus> = a devora. „O bacterie mică curbată care suge sucul celular din *Chlorella*".
- *Giardia lamblia* - de la Alfred Giard, un microbiolog francez și Vilem Lambl, un medic din Boemia, ambii lucrând cu microorganismul, un protozoar, care determină o infecție intestinală severă.

Locul microorganismelor în organizarea lumii vii

Pentru reflectarea organizării lumii vii este preferată utilizarea unui sistem de clasificare care arată gradul de înrudire al organismelor, un sistem care plasează organismele strâns înrudite în aceeași categorie. Acest model de organizare, numit **sistem natural** sau **filogenetic**, utilizează trăsături observabile selectate pentru a forma categorii.

Un sistem filogenetic este bazat pe conceptul de relații evolutive între tipuri de organisme. Din punctul de vedere cel mai simplist evoluția statuează că viețuitoarele se modifică treptat în sute de milioane de ani și că aceste progrese sunt exprimate în diferite tipuri de modificări structurale și funcționale în decurs de mai multe generații. Procesul de evoluție este selectiv: acele modificări care favorizează cel mai mult supraviețuirea unui organism particular sau grup de organisme tind să fie reținute, iar cele ce sunt mai puțin beneficiale pentru supraviețuire tind să fie pierdute. Existența evoluției este argumentată de o cantitate impresionantă de dovezi provenind din înregistrări fosile și din studii de morfologie, fiziologie și genetică (ereditate).

Evoluția ia în considerație milioane de specii diferite de pe Pământ și adaptarea lor la numeroase și diverse habitate. Ea este fundamentată pe două preconcepții: ✶ toate speciile noi își au originea din specii preexistente și ✶ organismele strâns înrudite au trăsături similare datorită faptului că s-au dezvoltat din strămoși comuni. Obișnuit, mersul evoluției progresează ascendent, iar stadiile evolutive se extind de la formele mai simple, mai primitive, care sunt mai apropiate de un organism ancestral, la forme avansate, mai complexe. Deși utilizăm termenii de primitiv, avansat pentru a denota gradul de modificare de la

setul original de trăsături ancestrale, este foarte important să realizăm că în timp ce toate speciile existente în prezent pe pământ sunt asociate epocii actuale, unele au luat naștere mai recent în istoria evolutivă față de altele.

Schemele evolutive ale organismelor sunt obișnuit trasate sub forma unui arbore genealogic, cu un trunchi reprezentând liniile ancestrale principale și ramificații corespunzând grupelor specializate de organisme. Acest tip de aranjament plasează grupele mai vechi în partea de jos și pe cele mai recente la vârf. Poziția ramificațiilor poate indica de asemenea gradul de apropiere în cadrul relațiilor și dacă se ia în considerație o scală de timp, începutul și durata unei perioade evolutive.

Regnuri

Primul arbore filogenetic al vieții a fost construit pe baza a două regnuri (plante și animale). Încă din secolul al XVIII-lea, celebrul botanist Carl Linnaeus încercând în opera sa *Systema naturae* (1735) o grupare a viețuitoarelor cunoscute, reunește toate microorganismele într-un singur grup numit semnificativ „Chaos". În timp, a devenit și mai clar că anumite organisme nu intră în mod adecvat în nici unul din cele două regnuri, astfel încât a fost recunoscut un al treilea regn (**Protista**) pentru organismele unicelulare, mai simple. În cele din urmă, au devenit evidente diferențe semnificative chiar în cadrul protistelor, astfel că Robert Whittaker a propus un al patrulea regn pentru bacterii și un al cincilea pentru fungi. Acest sistem curent acceptat plasează toate viețuitoarele în unul din cele cinci regnuri de bază: 1) **Procaryotae (Monera)**, 2) **Protista**, 3) **Fungi**, 4) **Plantae** și 5) **Animalia** (Fig. 3).

Constituirea acestor regnuri se bazează pe: tipul și structura celulară, natura organizării corpului și tipul de nutriție.

Regnul Procaryotae (numit și Monera) se află la baza arborelui genealogic și include organisme unicelulare cu celule procariote.

Structura celulară este caracteristica definitorie principală pentru acest regn. El cuprinde toate microorganismele cunoscute sub denumirea de bacterii și are două subgrupe principale: **eubacterii** - bacterii cu structură celulară procariotă caracteristică și **archaebacterii** - bacterii cu structură celulară și funcții atipice. Bacteriile primitive au fost primele celule care au apărut pe Pământ și strămoșii originari atât pentru bacteriile mai evoluate cât și pentru organismele eucariote, a căror origine probabilă din celulele procariote este furnizată de teoria endosimbiotică.

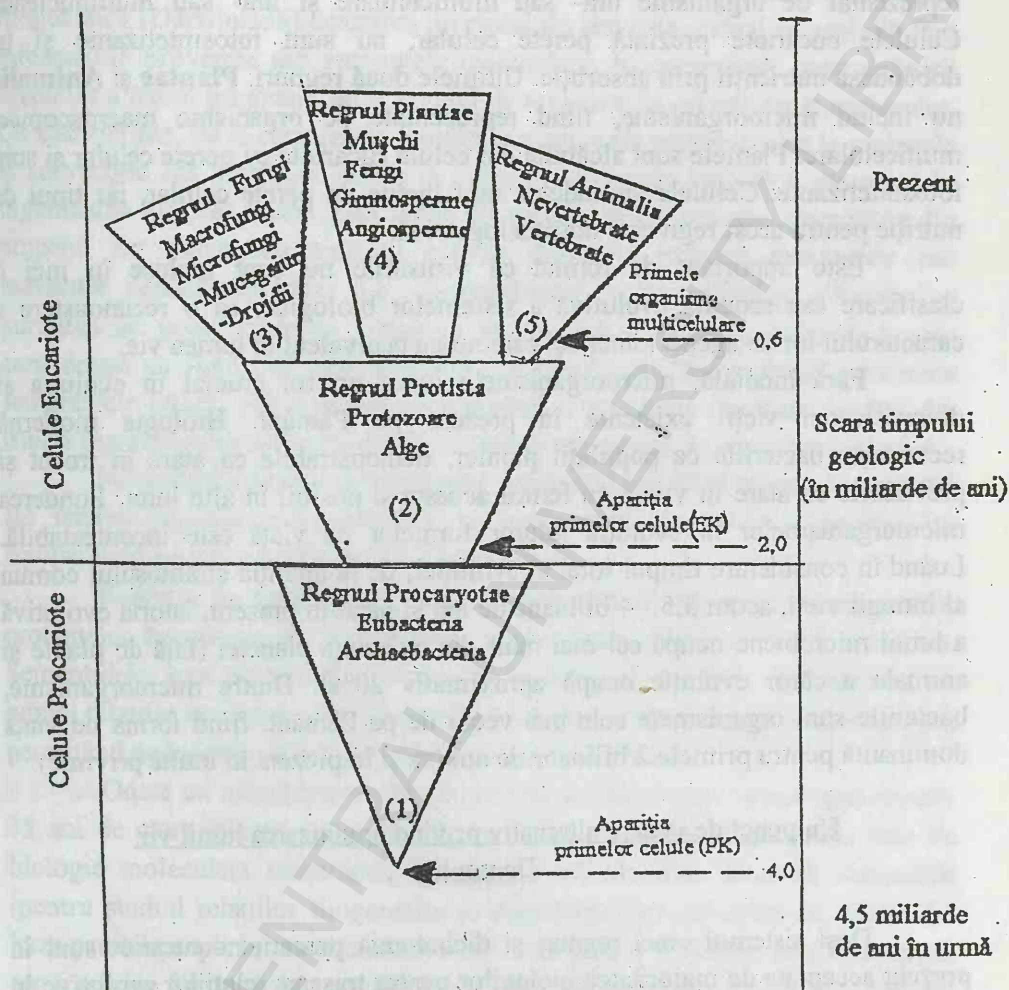


Fig. 3. Sistemul de clasificare a lumii vii în 5 regnuri.

Regnul Protista conține cea mai mare parte a microorganismelor eucariote unicelulare care sunt lipsite de nivele mai complexe de organizare (țesuturi): **alge microscopice** care se caracterizează prin celule fotosintetizante mărginite de perete și **protozoare** care sunt lipsite de perete celular și se hrănesc pe seama altor organisme prin ingestie. **Regnul Fungi** (sau Myceteae) este

reprezentat de organisme uni- sau multicelulare și uni- sau multinucleate. Celulele eucariote prezintă perete celular, nu sunt fotosintetizante și își dobândesc nutrienții prin absorbție. Ultimele două regnuri: **Plantae** și **Animalia** nu includ microorganisme, fiind reprezentate de organisme macroscopice, multicelulare. Plantele sunt alcătuite din celule eucariote cu perete celular și sunt fotosintetizante. Celulele animalelor sunt lipsite de perete celular, iar tipul de nutriție pentru acest regn este nutriția ingestivă.

Este important de reținut că virusurile nu sunt incluse în nici o clasificare sau schemă evolutivă a sistemelor biologice, ca o recunoaștere a caracterului lor de agenți infecțioși care nu au echivalent în lumea vie.

Fără îndoială, microorganismele joacă un rol crucial în evoluția și diversificarea vieții existente în prezent pe Pământ. Biologia modernă recunoaște bacteriile ca populații pionier, demonstrabile ca atare în trecut și previzibile ca atare în viitor, în lumea aceasta și posibil în alte lumi. Ponderea microorganismelor în evoluția tuturor formelor de viață este incontestabilă. Luând în considerare timpul total al evoluției, de la apariția strămoșului comun al întregii vieți, acum 3,5 - 4 bilioane de ani și până în prezent, istoria evolutivă a lumii microbiene ocupă cel mai mult din existența planetei (față de plante și animale a căror evoluție ocupă aproximativ 20%). Dintre microorganisme, bacteriile sunt organismele cele mai vechi de pe Pământ, fiind forma de viață dominantă pentru primele 2 bilioane de ani (ca și în prezent în multe privințe).

Un punct de vedere alternativ privind organizarea lumii vii. Domenii

Deși sistemul cinci regnuri și dichotomia procariot - eucariot sunt în prezent acceptate de majoritatea biologilor pentru trasarea relațiilor evolutive în cadrul lumii vii, studii recente de biologie moleculară conduc către o alternativă restructurată a ordinei universale a organismelor. Datele acestor studii pot conduce la o posibilă redefinire a schemei evolutive curente.

De fapt, includerea microorganismelor în sistemul de clasificare a lumii vii forțează o modificare radicală privind baza definirii taxonilor. Criteriile fenotipice clasice în sistematică sunt în curs de a fi înlocuite de criterii moleculare. Pentru definirea relațiilor evolutive, în mod particular pentru microorganisme, nivelul molecular (secvențe și structuri moleculare) este mai

relevant decât fenotipurile clasice. În lumea microorganismelor, clasificarea filogenetică (Darwiniană) deasupra nivelului de gen este virtual imposibilă fără informațiile provenite din secvențele moleculare. În consecință, baza definirii taxonilor a trecut progresiv de la nivelul de organism la cel celular și molecular. Cu alte cuvinte, de la caracterele fenotipice clasice ale organismelor la molecule și secvențele lor. Pornindu-se de la ideea că sistemele biologice păstrează în organizarea lor, sub forma unor molecule caracteristice, cea mai mare parte din propriul lor trecut, cu ajutorul acestor molecule (numite **semantide** sau **molecule semantoforetice**; Gr. <semantikos> = semnificație; <forein> = purtător) se poate construi filogenia moleculară. Filogenia moleculară este considerată ca fiind cea mai rațională, universală și informațională, deoarece semantidele (ADN, ARN, proteine) păstrează o mai mare cantitate de date din istoria organismului respectiv decât oricare alt nivel unic de integrare biologică.

Macromoleculele informaționale (semantidele) fiind efectiv înregistrări ale istoriei organismului respectiv se procedează la *citirea* și analiza lor comparativă pentru a revela relațiile genealogice.

Evoluția bacteriilor este astfel înregistrată în secvența aminoacizilor, proteinelor bacteriene și în secvența nucleotidelor ARN și ADN bacterian. Semantidele sunt adevărate *cronometre moleculare* capabile să măsoare nu numai relațiile evolutive, ci și distanțele evolutive (timpul relativ al divergenței) permițând deducerea caracteristicilor unui ancestor comun.

Odată cu introducerea conceptului de archaebacterii, acum aproximativ 15 ani de către Woese, moment din care s-au acumulat foarte multe date de biologie moleculară bacteriană, s-a propus ca cea mai adecvată semantidă (pentru studiul relațiilor filogenetice și măsurarea lor) molecula de ARNr. La baza acestei propuneri au stat următoarele argumente: ♦ ARNr, ca și ribozomii, are o origine foarte veche, este universal răspândit și ușor de izolat; ♦ el a rămas constant ca funcție de-a lungul unor mari distanțe evolutive; ♦ structura primară a ARNr variază puțin de la o specie la alta și conține secvențe foarte conservatoare, care se modifică lent în timp, în așa fel încât secvențele ancestrale pot fi încă detectate, favorizând stabilirea distanțelor evolutive dintre specii foarte îndepărtate. Cel mai potrivit dintre tipurile de ARNr cunoscute este ARNr 16S, care este suficient de mare pentru a forma un ansamblu statistic suficient de sigur pentru studiul relațiilor filogenetice.

Ribozomii sunt esenţiali pentru toate formele de viaţă pe Pământ şi secvenţele nucleotidelor ARNr reflectă istoria evolutivă a celulei în care se găseşte ARNr. Pe baza similarităţilor şi diferenţelor dintre ARNr de la un număr mare şi diferit de specii, archaebacteriile s-au dovedit a nu fi nici procariote, nici eucariote. Numai perceperea faptului că **moleculele semantoforetice** (ADN, ARN, proteine) reprezintă **cronometre moleculare**, (înregistrând evenimentele filogenetice în cursul istoriei organismelor) a dat posibilitate stabilirii de relaţii filogenetice chiar între organismele cele mai diverse fenotipic şi construirii unui sistem universal natural (genealogic).

Arborele filogenetic bazat pe compararea secvenţei acizilor ribonucleici ribozomali (din subunitatea mică) proprii organismelor din toate regnurile recunoscute în prezent arată trei grupări clar separate genealogic.

Toate eucariotele, inclusiv aşa numitele „protiste", sunt asamblate într-un grup monofiletic, în timp ce procariotele sunt segregate în 2 grupe monofiletice, care au fost iniţial numite ***eubacterii*** şi ***archaebacterii***.

Datele obţinute prin comparaţii moleculare au relevat faptul că:

⌘ Diferenţele dintre regnul Monera (Procaryotae) şi celelalte 4 regnuri sunt mult mai semnificative şi de natură calitativ diferită decât diferenţele între cele 4 regnuri de organisme eucariote.

⌘ Conceptul procariot - eucariot este fundamental citologic şi numai secundar şi prin deducţie filogenetic.

⌘ La nivel citologic, archaebacteriile sunt procariotae (nu manifestă nici una dintre caracteristicile care definesc eucariotele), dar la nivel molecular nu se aseamănă mai mult (probabil mai puţin) cu alte procariote (eubacterii) decât cu eucariotele.

⌘ Trăsăturile biochimice şi moleculare (acumulate în circa 15 ani de cercetare declanşată de conceptul archaebacteriilor al lui Carl Woese) sunt unice pentru archaebacterii, argumentând gruparea lor separată de bacterii.

⌘ Viaţa pe această planetă se împarte fundamental în trei grupări primare foarte deosebite. Diferenţele ce separă aceste trei linii fundamentale de descendenţă sunt de o natură mai profundă decât diferenţele care separă regnurile tipice, cum ar fi plantele şi animalele.

S-a conturat astfel, în acord cu cele mai noi introspecţii moleculare, un sistem formal al organismelor, în care Woese şi colaboratorii (începând din anul 1990) propun un nou taxon la nivelul cel mai superior (deasupra celui de regn),

valid din punct de vedere filogenetic și denumit **domeniu** (echivalent Latin <regio>). Arborele filogenetic (Fig. 4), bazat în primul rând pe comparațiile secvenței ARNr analizat la organisme aparținând tuturor regnurilor recunoscute în prezent, arată 3 grupări (= domenii) clar separate genealogic: **Archaea** (anterior archaebacterii), **Bacteria** (anterior eubacterii) și **Eucarya** (anterior eucariote), fiecare cu două sau mai multe regnuri.

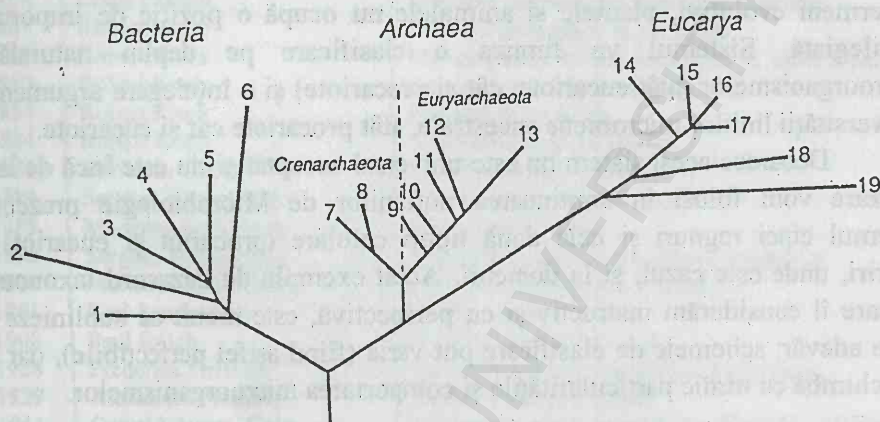


Fig. 4. Arbore filogenetic universal prezentând cele 3 domenii în care se încadrează organismele și subîmpărțirea domeniului *Archaea* în 2 regnuri (regnurile din interiorul celorlalte domenii rămân de definit). Ordinea ramificării și lungimea ramurilor se bazează pe compararea secvențelor de ARNr.

În acest sistem:

✱ Se propune abandonarea termenului de archaebacterii, deoarece el sugerează incorect o relație specifică între **Archaea** și **Bacteria**. O relație de înrudire (dar distanțată) există între **Archaea** și **Eucarya** deoarece, cu câteva excepții, asemănările la nivel molecular sunt mai mari între aceste domenii decât între **Archaea** și **Bacteria** sau în unele cazuri homologii **Archaea - Eucarya** nu au echivalent la **Bacteria**.

✱ Pentru domeniul **Eucarya** se păstrează regnurile Plante, Animale, Fungi (restructurate cu introspecții moleculare) și se înlocuiește regnul Protista cu o serie de regnuri corespunzând liniilor evolutive.

✱ Pentru **Bacteria** se preconizează că majoritatea diviziunilor descrise vor deveni regnuri.

✱ Domeniul **Archaea** este subdivizat formal în două regnuri: *Euryarchaeota* (cuprinde metanogenele și diverse organisme înrudite fenotipic acestora) și *Crenarchaeota* (cuprinzând un grup relativ restrâns de microorganisme termofile extreme al căror fenotip general se aseamănă cel mai mult cu fenotipul ancestral de *Archaea)*.

După opinia autorilor acestui sistem de clasificare a lumii vii, cel puțin în termeni evolutivi, plantele și animalele nu ocupă o poziție de importanță privilegiată. Sistemul va furniza o clasificare pe deplin naturală a microorganismelor (atât eucariote, cât și procariote) și o înțelegere argumentată a diversității liniilor microbiene ancestrale, atât procariote cât și eucariote.

Deoarece acest sistem nu este universal acceptat și nu este încă de largă utilizare vom folosi în continuarea noțiunilor de Microbiologie prezentate sistemul cinci regnuri și cele două tipuri celulare (procariot și eucariot) cu referiri, unde este cazul, și la domenii. Acest exemplu de dezacord taxonomic, pe care îl considerăm instructiv și cu perspectivă, este menit să sublinieze un mare adevăr: schemele de clasificare pot varia (fiind astfel perfectibile), dar ele nu schimbă cu nimic particularitățile și comportarea microorganismelor.

Date semnificative pentru istoricul Microbiologiei

În prezent acceptăm faptul că microorganismele se găsesc aproape pretutindeni. A existat însă o perioadă în care microorganismele nu puteau fi văzute, neexistând microscoape, perioadă în care celulele nu erau cunoscute oamenilor de știință și în care se considera că viața ia naștere spontan din materia nevie.

În trecutul nu prea îndepărtat, alterarea alimentelor adesea nu putea fi controlată, familii întregi mureau în urma vaccinărilor, iar antibioticele nu erau disponibile pentru eradicarea unei infecții.

Conceptele actuale din Microbiologie vor fi mai ușor înțelese și evaluate dacă luăm în considerație câteva date semnificative legate de microorganisme, care au schimbat viața noastră de-a lungul timpului. Prezentarea în continuare a istoricului Microbiologiei nu este exhaustivă, ci se rezumă la cele mai reprezentative descoperiri și nume de seamă asociate acestora, de-a lungul ultimilor aproximativ 300 de ani: microscopia, apariția metodei științifice, teoria germenilor de boală, originile tehnicilor microbiologice moderne (tabel nr. 3). Unele din datele prezentate ilustrează apariția unor domenii particulare ale Microbiologiei.

Tabelul nr. 3.

300 de ani de Microbiologie: unele publicaţii de marcă în Microbiologie, 1684 - 1983*.

An	Descoperitor(i)	Descoperire
1684	Antonie van Leeuwenhoek	Descoperirea bacteriilor
1857	Edward Jeener	Vaccinarea antivariolică
1798	Louis Pasteur	Microbiologia fermentaţiei lactice
1860	Louis Pasteur	Rolul drojdiilor în fermentaţia alcoolică.
1864	Louis Pasteur	Încetarea controversei generaţiei spontane
1867	Robert Lister	Principii antiseptice în chirurgie
1881	Robert Koch	Metode pentru studiul bacteriilor în cultură pură.
1882	Robert Koch	Descoperirea cauzei tuberculozei
1884	Robert Koch	Postulatele lui Koch
1884	Robert Koch	Decoperirea cauzei holerei
1884	Christian Gram	Metoda coloraţiei Gram
1889	Serghei Winogradski	Conceptul de chemolitotrofie
1889	Martinus Beijerinck	Conceptul de virus
1890	Serghei Winogradski	Dezvoltarea autotrofă a chemolito-trofilor
1901	Martinus Beijerinck	Metoda de îmbogăţire a culturilor
1901	Karl Landsteiner	Grupe sanguine umane
1908	Paul Erlich	Agenţi chimioterapeutici
1928	Frederick Griffith	Descoperirea transformării la pneumococ
1929	Alexander Fleming	Descoperirea penicilinei
1944	Oswald Avery, Colin Macleod, Maclyn Mcarty	Explorarea experimentelor lui Griffith - ADN este material genetic
1944	Selman Waksman	Descoperirea streptomicinei
1953	James Watson, Francis Crick	Structura ADN
1959	Arthur Pardee, Francois Jacob, Jacques Monod	Reglarea genetică printr-o proteină represor
1959	Rodney Porter	Structura imunoglobuluinei
1959	F. Macfarlaine Burnet	Teoria selecţiei clonale
1960	Francois Jacob, David Perrin, Carmon Sanchez, Jacques Monod	Conceptul de operon
1975	George Kohler, Cesar Milstein	Anticorpi monoclonali
1976	Susumu Tonegawa	Rearanjarea genelor imunoglobulinei
1977	Fred Sanger, Steven Niklen, Alan Coulson	Metode de secvenţializare ADN
1983	Luc Montagnier	Descoperirea HIV, cauza AIDS

* Sursele majore de referinţă includ Brock T.D. (1961), *Milestones in Microbiology*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.; Brock T.D. (1990), *The Emergence of Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Madigan M.T. et al. (1997), *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall Int., Inc. Anul se referă la anul în care a fost publicată descoperirea.

În comparație cu celelalte științe biologice, Microbiologia reprezintă un domeniu relativ nou, deoarece cunoașterea lumii microorganismelor a fost legată de dezvoltarea instrumentelor de observație și a tehnicilor de izolare din habitatele naturale și cultivare în laborator, pentru a putea fi studiată. În particular, identificarea și studiul unui microorganism necontaminat de altele necesită metode adecvate de sterilizare și transfer aseptic.

Fără descoperirea instrumentului optic cunoscut sub denumirea de **microscop** lumea vastă și diversă a microorganismelor nu ar fi putut fi cunoscută.

Microscopul a relevat microorganismele sub forma unor mici entități care au multe caractere comune cu organismele mai mari, vizibile ochiului liber, dar de care se deosebesc profund.

ANTONIE VAN LEEWENHOEK (1632 - 1723) este cel care a descoperit lumea invizibilă a microorganismelor, fiind primul care le-a observat prin mărire cu ajutorul lentilelor. În prima din seria de scrisori adresate Societății regale din Londra, scrisă în 1673, Leeuwenhoek descrie „animalculele" (animale foarte mici mobile) pe care le-a observat la microscopul simplu (cu o singură lentilă) de construcție personală, cu o putere de mărire de 40 - 275 x. Pe baza desenelor detaliate ale „animalculelor" observate pe preparate provenind din diverse medii (apă de ploaie, infuzie de boabe de piper, material recoltat prin raclarea suprafeței dinților ș.a.), acestea au fost ulterior (peste un secol) identificate ca fiind reprezentanți ai bacteriilor, drojdiilor și protozoarelor. În felul acesta, Leeuwenhoek a atras atenția asupra lumii microorganismelor, fără să le acorde însă statutul unor organisme aparte.

Din perioada lui Leeuwenhoek, microscoapele au evoluat ca instrumente mai complexe, cu îmbunătățiri legate de adăugarea unor lentile finisate, a unui condensator, a unor mijloace speciale de focalizare și de utilizare a surselor de lumină. Prototipul microscopului compus modern, utilizat de pe la mijlocul anului 1800, realiza măriri de 1000 x sau mai mari. Microscoapele moderne de laborator, utilizate curent astăzi nu diferă fundamental ca structură și funcție de acele microscoape compuse.

Descoperirea structurilor numite celule, relatată în 1665 ca urmare a observațiilor realizate la microscop de ROBERT HOOKE, a marcat începutul unei teorii celulare, consolidate ulterior (1838 - 1839) de către botanistul MATTHIAS SHLEIDEN și zoologul THEODOR SCHWANN. Cercetările acestora din urmă au stabilit clar teoria conform căreia toate viețuitoarele, deci și

microorganismele, sunt alcătuite din celule, iar studiile ulterioare privind structura și funcțiile celulelor au avut la bază această teorie celulară, care este una din cele mai importante generalizări ale Biologiei moderne.

Cercetarea microorganismelor a beneficiat după o lungă perioadă de timp scurs de la descoperirea lor de utilizarea metodei științifice, a unui sistem experimental, necesar pentru explicarea fenomenelor naturale. Utilizarea metodei științifice furniza un răspuns obiectiv întrebărilor, înlocuind explicațiile bazate pe prejudecăți, superstiții, credință.

Cercetarea microbiologică a fost dominată de LOUIS PASTEUR (1822 - 1895), unul dintre întemeietorii științelor microbiologice, cel care a înființat primele laboratoare de cercetare, punând bazele științifice ale Microbiologiei. L. Pasteur este considerat geniul Microbiologiei. Nici un alt microbiolog din istorie nu egalează întinderea și impactul contribuțiilor incredibile ale lui Pasteur în știință (Fig. 5).

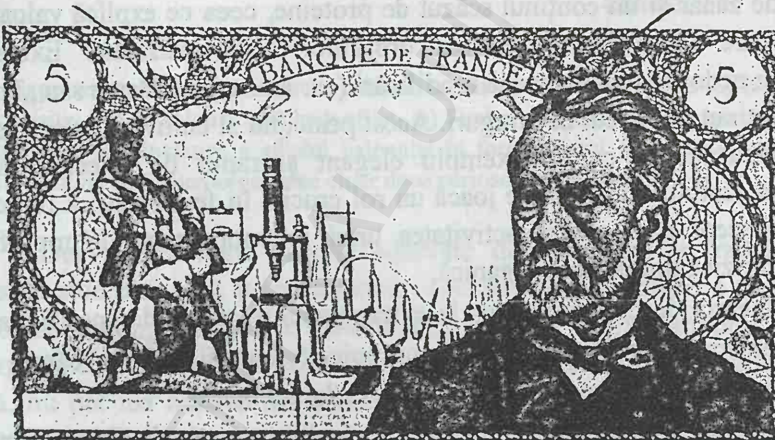


Fig. 5. Bancnotă de 5 franci care ilustrează artistic multe din realizările lui Pasteur. Săgețile de sus, stânga și dreapta, indică oile și puii de găină care semnifică descoperirea vaccinurilor contra antraxului și respectiv holerei găinilor. Săgeata de jos indică măduva spinării unui iepure turbat, într-un flacon de desicație, utilizată pentru prima dată pentru a-l trata pe Joseph Meister, băiatul reprezentat luptându-se cu un câine turbat. Cristalele din stânga și dreapta ilustrează relațiile structurii cristaline cu rotația optică. Ciorchinii de strugure se referă la studiul bolilor vinului și descoperirea pasteurizării, iar balonul cu „gât de lebădă" de lângă portretul lui Pasteur, amintește de disputa sa privind teoria generației spontane. Bacilii cu flageli din jurul cifrelor 5 se referă la descoperirea existenței vieții în anaerobioză. Reversul bacnotei ilustrează, alături de portretul lui Pasteur, fungi, dude (sugerând studiul bolilor viermilor de mătase) și struguri.

Primele lucrări de Microbiologie, datorate lui Pasteur, apar în jurul anului 1848. De formație biochimist, L. Pasteur a devenit interesat în studiul proceselor fermentative prin descoperirea izomeriei optice ca o particularitate a anumitor produși de fermentație (ex: acidul tartric). Pasteur a demonstrat că fermentațiile, considerate anterior procese pur chimice, sunt procese biologice determinate de acțiunea microorganismelor, în special anaerobe. El afirmă că „fermentațiile sunt viață fără aer" și că diferite tipuri de microorganisme sunt asociate cu diferite tipuri de fermentație: drojdiile cu fermentația alcoolică, lactobacilii cu fermentația lactică. Întrucât natura unei fermentații specifice depinde de microorganismul responsabil, s-a pus întrebarea cum este posibil ca un anumit tip de substrat, fără a fi în mod deliberat inoculat cu un microorganism particular, să sufere regulat un anume fel de fermentație. Explicația a fost dată de Pasteur prin stabilirea *principiului cultivării selective*: diferitele organisme sunt ubicvitare și în cele din urmă predomină cel mai adaptat la un mediu dat. De exemplu, sucul de struguri are o concentrație ridicată de zahăr și un conținut scăzut de proteine, ceea ce explică valoarea pH scăzută care favorizează creșterea drojdiilor acido-rezistente. Excesul de organisme nedorite poate duce la modificări (ex: arome) neplăcute sau „boli" ale vinului obținut din sucul de struguri. Acest principiu al cultivării selective poate fi interpretat acum ca un exemplu elegant și rapid de selecție naturală. Realizarea faptului că drojdiile joacă un rol crucial în fermentații a reprezentat primul concept care asocia activitatea unui microorganism de modificările chimice și fizice din materia organică.

Această descoperire a dus la extrapolarea relațiilor de specificitate ale microorganismelor, cu organisme macroscopice (plante și animale) cărora le pot cauza boli, instituindu-se astfel *teoria germenilor de boală*.

Pentru împiedicarea alterării vinului și berii sub acțiunea microorganismelor contaminante, Pasteur a imaginat procedeul încălzirii blânde (pasteurizare) aplicat ulterior și laptelui și utilizat ca procedeu de sterilizare (distrugerea germenilor preexistenți de pe materialele de lucru și din mediile de cultură) și în domeniul medical. Au fost puse astfel bazele tehnicilor aseptice (împiedicarea contaminării cu germeni din afară în timpul lucrului) care constituie în prezent baza tehnicilor standard de laborator practic și a numeroase procedee medicale.

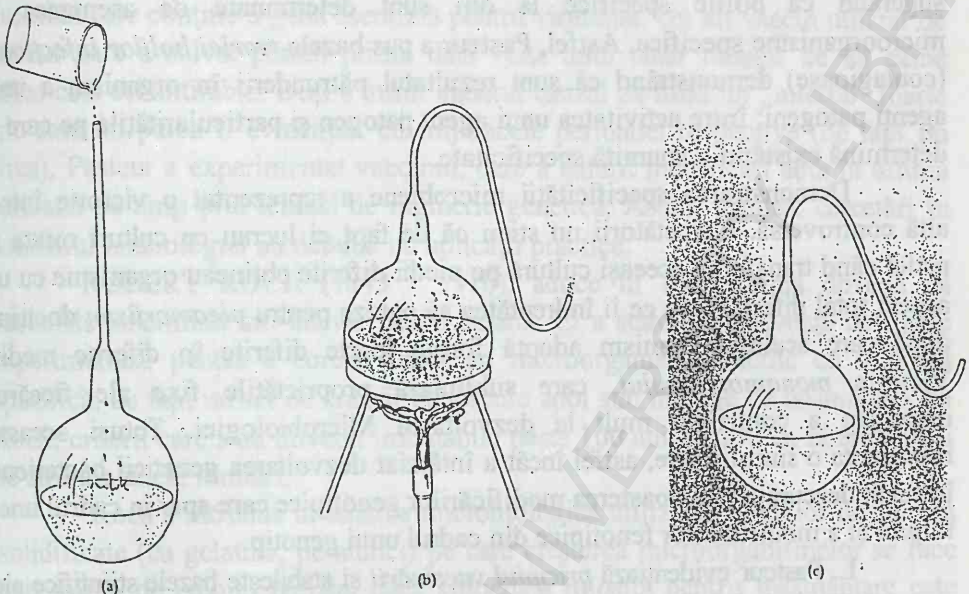


Fig. 6. Experimentul lui Pasteur care a infirmat teoria generației spontane. (a) Introducerea de bulion nutritiv într-un balon cu gât lung efilat. (b) Fierberea timp de câteva minute a bulionului după curbarea prin încălzire a gâtului balonului în forma literei S („găt de lebădă"). (c) În bulionul răcit nu apar microorganisme chiar după perioade lungi de timp.

Dezvoltarea unor metode adecvate de sterilizare și transfer aseptic, necesare studiului unui microorganism necontaminat de altele a fost stimulată de controversa privind *teoria generării spontane a vieții*. Pasteur a demonstrat în experimentele sale de laborator că microorganismele, care reprezintă forme de viață, nu pot lua naștere din substanță organică neanimată, cum se credea, ci întotdeauna din microorganisme care pătrund de la exterior (Fig. 6). Agentul care realizează fermentația are deci o origine exogenă.

În cursul stabilirii naturii fermentațiilor, Pasteur a fundamentat studiul metabolismului microbian realizând introspecții profunde în mai multe din aspectele sale. În particular, a arătat că viața este posibilă fără aer și că anumite microorganisme (obligat anaerobe) sunt chiar inhibate de aer. De asemenea, a arătat că fermentația este mult mai eficientă decât respirația în termenii producerii de masă celulară per unitate de substrat consumat. Arătând rolul microorganismelor specifice, atât în diferite fermentații normale, cât și în

„bolile” berii și vinului, Pasteur stabilește *principiul specificității microbiene*, sugerând că bolile specifice la om sunt determinate de asemenea de microorganisme specifice. Astfel, Pasteur a pus bazele *teoriei bolilor infecțioase* (contagioase) demonstrând că sunt rezultatul pătrunderii în organism a unor agenți patogeni; între activitatea unui agent patogen și particularitățile pe care le determină existând o anumită specificitate.

Demonstrarea specificității microbiene a reprezentat o victorie într-o altă controversă. Cercetătorii nu știau că de fapt ei lucrau cu culturi mixte și astfel când transferau aceeași cultură pe medii diferite obțineau organisme cu un aspect total diferit, ceea ce îi îndreptățea să opteze pentru *pleomorfism*: doctrina după care același organism adoptă forme foarte diferite în diferite medii. Victoria *monomorfismului*, care subliniază proprietățile fixe ale fiecărui organism a contribuit mult la dezvoltarea Microbiologiei. Totuși aceasta reprezenta o simplificare, astfel încât a întârziat dezvoltarea geneticii bacteriene întrucât descuraja recunoașterea modificărilor genotipice care apar în cadrul unei tulpini și a modificărilor fenotipice din cadrul unui genotip.

L. Pasteur evidențiază *pricipiul vaccinării* și stabilește bazele științifice ale preparării vaccinurilor, contribuind în același timp la descoperirea fenomenului de imunitate. Fără ecou din punct de vedere științific, primul vaccin folosit în practică este cel antivariolic descoperit și utilizat de E. JENNER în 1796. Pasteur a demonstrat pentru prima dată că agenții patogeni, chiar cei mai periculoși, pot fi modificați pentru a fi folosiți ca vaccinuri. El a numit vaccinuri (Lat. <vacca>) culturile avirulente utilizate pentru inocularea preventivă. Vaccinurile stimulează imunitatea față de tulpina microbiană virulentă.

Studiind boala holera găinilor, Pasteur observă că agentul ei patogen își pierde complet, prin învechirea culturii, capacitatea sa specifică de a produce această boală, adică devine avirulent. Inoculată la păsări sănătoase, cultura avirulentă le conferă însă rezistență față de holeră, în sensul că ele nu se mai îmbolnăvesc nici dacă sunt infectate cu o cultură proaspătă, virulentă: păsările „vaccinate” au devenit „imune” (sunt apărate) în urma contactului lor prealabil cu agentul patogen specific lipsit de virulență. Prin această descoperire, Pasteur pune bazele științifice ale vaccinării care au permis extinderea ei ca procedeu de prevenire a infecțiilor.

Prin încălzire la temperatură ridicată, Pasteur a obținut un vaccin bacterian atenuat împotriva anthraxului (cărbune sau dalac). În prezent se

cunoaște că acest procedeu constă de fapt în „vindecarea" bacteriei de o plasmidă care conține o genă esențială pentru virulență. Un alt vaccin utilizat de Pasteur care a salvat pentru prima dată viața unui tânăr mușcat de un câine turbat este cel antirabic. Deși a intuit agentul cauzal ca fiind un „microb" foarte mic care nu putea fi evidențiat cu mijloacele perioadei respective (de fapt un virus), Pasteur a experimentat vaccinul, care a suferit modificări abia în ultima perioadă de timp prin tehnici de inginerie genetică. Astfel, primele cercetări în domeniul *Imunologiei* au debutat cu aplicații practice.

ROBERT KOCH (1843 - 1916), aduce în 1876 prima dovadă că bacteriile determină într-adevăr boala umană. El a stabilit o secvență de trepte experimentale pentru a corela direct un microorganism specific cu o boală specifică; de fapt un set de criterii cunoscute apoi sub numele de *postulatele lui Koch*, criterii care s-au dovedit imbatabile peste 100 ani, pentru ca ulterior să li se atribuie unele limitări.

Koch a introdus în tehnica microbiologică utilizarea mediilor de cultură solidificate (cu gelatină, pe atunci) pe care creșterea microorganismelor se face sub formă de colonii izolate, dacă suspensia folosită pentru însămânțare este suficient de diluată. Cum o colonie microbiană reprezintă descendența unei singure celule parentale, însămânțarea ei ulterioară într-un mediu steril generează o cultură de celule din aceeași specie sau tulpină. Descoperirea acestei posibilități de a obține culturi pure a constituit un progres care a stat la baza Microbiologiei moderne, deoarece a oferit un mijloc simplu și sigur de izolare a bacteriilor, în vederea studierii particularităților lor de specie și a biologiei lor, a identificării și a încadrării lor sistematice. Koch a utilizat tehnici de colorație cu coloranți de anilină pentru preparatele microscopice (frotiuri) și în 1882 a identificat bacilul care-i poartă numele (B.K.), agentul patogen al tuberculozei.

HANSEN (1842 - 1909) deschide calea *Microbiologiei industriale* moderne, prin utilizarea culturilor pure ca starteri de fermentație.

Un rol de o importanță deosebită pentru dezvoltarea biochimiei și a industriei fermentative și de biosinteză l-a avut apariția *enzimologiei microbiene.*

BUCHNER confirmă în 1897 rezultatele cercetărilor lui Pasteur asupra fermentațiilor și le completează cu date noi. El demonstrează că și extractul acelular obținut din celulele de drojdii de bere, după dezintegrarea lor prin sfărâmare în mojar cu nisip, poate produce fermentația zahărului la alcool și CO_2, datorită sistemului enzimatic complex pe care îl conține și care este activ și

după izolarea lui din celulele vii. Ulterior, în 1905, HARDEN și YOUNG arată că, în afară de enzimele termolabile cu molecule mari, extractul de drojdii de bere conține și un factor termostabil cu moleculă mică, absolut esențial pentru funcționarea sistemului enzimatic descris de Buchner. Acest factor este cozimaza, care, după cum s-a demonstrat foarte curând după aceea, este implicată și în metabolismul țesuturilor animale. Studiul cozimazei levurilor a permis elucidarea mecanismului oxidării biologice și a demonstrat că unul și același factor este necesar ca un component esențial al proceselor metabolice fundamentale la microorganisme și în țesuturile animale, ceea ce a constituit una dintre primele demonstrații ale similitudinii proceselor metabolice de bază la organismele din întreaga natură vie. În același timp, aceste cercetări au deschis larg perspectiva extrem de importantă a utilizării microorganismelor ca modele experimentale în diferite ramuri ale științelor biologice.

I. MECINIKOV (1845 - 1946), lucrând la Institutul Pasteur din Paris, a evidențiat procesul de *fagocitoză*, demonstrând pentru prima dată rolul leucocitelor din sânge în reacțiile de apărare ale organismului față de agenții patogeni, prin înglobarea și distrugerea acestora (*apărarea celulară*).

P. EHRLICH (1854 - 1915), pe lângă studiul reacțiilor imunologice ale organismelor (*apărarea umorală*), este și creatorul *teoriei moderne a dezinfecției și chimioterapiei selective*. Bazat pe concepția că trebuie să existe anumite substanțe cu acțiune selectivă asupra paraziților, netoxice sau cu toxicitate slabă pentru celulele organismului gazdă, el sintetizează primele substanțe chimice active în terapia bolilor produse de spirochete și protozoare. Lucrările sale au deschis calea spre era substanțelor chimioterapice, ce începe odată cu realizarea ulterioară a sintezei sulfamidelor.

S. WINOGRADSKI (1856 - 1953), întemeietorul *Microbiologiei solului*, lucrând la Institutul Pasteur din Paris, a descris procesul de asimilare la organismele chimiosintetizante și fenomenul de fixare a azotului atmosferic de către microorganisme. În același timp, el a elaborat metode speciale pentru cercetarea activității microorganismelor din sol.

A. FLEMING (1881 - 1955) deschide prin lucrările sale era antibioticelor, de o importanță excepțională în medicină și biologie. În 1929 el observă că unele culturi ale mucegaiului *Penicillium* elaborează o substanță cu proprietăți antimicrobiene specifice - *penicilina*. Acest prim antibiotic cunoscut a fost mai târziu purificat de Florey și Chain (1940), care au oferit astfel

terapeuticii antiinfecţioase un produs cristalizat, stabil, atoxic pentru om şi animal, activ *in vivo* asupra unor anumite specii de microorganisme.

În 1939, R. DUBOS elaborează o tehnică generală ce permite cercetarea sistematică a capacităţii de producere a antibioticelor la microorganismele saprofite, iar în 1944 S. WAKSMAN descoperă *streptomicina*, antibiotic elaborat de multe specii de actinomicete şi deschide calea pentru obţinerea din natură a anumitor antibiotice noi.

Primul cercetător care a lucrat cu *virusuri* a fost D. IVANOVSKI (1864 - 1920), care în 1892 a studiat *boala mozaicului tutunului*, demonstrând că boala poate fi transmisă de la o plantă bolnavă la una sănătoasă printr-un suc acelular. El nu a sesizat natura specială a agentului patogen, lucru pe care l-a făcut BEIJERINCK în 1898, caracterizându-l ca un „contagium, vivum, fluidum". Cel puţin două dintre atributele date de Beijerinck sunt discutabile, dacă nu inexacte. A fost descoperit astfel independent de către Ivanovski şi Beijerinck primul virus recunoscut ca filtrabil: virusul mozaicului de tutun (VMT). În 1898 şi respectiv 1900 au fost descoperite şi primele virusuri ale animalelor şi omului.

Intuiţia genială privind diferenţele dintre natura virusurilor şi a microorganismelor fac din Beijerinck adevăratul întemeietor al *virologiei* ca ştiinţă. Dezvoltarea ulterioară a acestui domeniu şi în special perfecţionarea tehnicilor de lucru au permis izolarea, identificarea şi caracterizarea a diferite virusuri patogene pentru plante, animale şi om, inclusiv a unor virusuri producătoare de tumori maligne - proces care continuă şi în prezent.

Un rol deosebit în evoluţia conceptelor fundamentale de bacteriologie şi virologie l-a avut descoperirea *bacteriofagilor* (virusuri care parazitează bacteriile) de către TWORT (1915) şi d'HÉRELLE (1917), precum şi a fenomenului de *lizogenie*.

Descoperirea bacteriofagului a furnizat Biologiei nu numai cunoaşterea unei entităţi noi, implicată în procesele ecologice şi evolutive din lumea microorganismelor, ci şi un model experimental preţios, reprezentat de sistemul fag - bacterie, care a contribuit într-o măsură nebănuită la restructurarea unor concepte de bază în Biologie (*Biologie moleculară*).

Contribuţii deosebite la definirea virusurilor la nivel conceptual au fost aduse abia după 1953 de către A. LWOFF care a stabilit norme care permit definirea caracterelor particulare ale acestor agenţi infecţioşi. Consacrându-şi

peste 30 de ani de activitate studiului virusurilor, Lwoff a analizat, printre altele, relația dintre fag și bacterie cu posibilitatea integrării genomului fagic în structura cromozomului bacterian (lizogenie) și a sugerat intervenția unui mecanism similar în patogenia cancerului.

Agenții infecțioși subvirali au fost izolați și parțial caracterizați în 1971 de DIENER, când s-a demonstrat că moleculele de ARN nude - numite *viroizi* - pot determina efecte patogene la plante și în 1981 - 1984 când s-a demonstrat de către PRUSINER că moleculele de proteine numite *prioni* - pot fi infecțioase pentru om și animale.

<u>În țara noastră</u>, doi savanți de renume mondial, VICTOR BABEȘ și IOAN CANTACUZINO au contribuit în mod substanțial la fondarea Microbiologiei moderne.

V. BABEȘ (1854 - 1926) a lucrat în laboratorul lui Pasteur, la Paris, iar mai târziu, în laboratorul lui Koch. De formație anatomopatolog, și-a însușit tehnicile microbiologice și a orientat investigația medicală spre studiul morfologic al acțiunii reciproce microorganism - gazdă. Aceste preocupări i-au dat prilejul să colaboreze cu A.V. Cornil la *primul tratat de bacteriologie din lume*, apărut la Paris în 1885. A descoperit noi specii microbiene, a pus în evidență *corpusculii Babeș - Negri* în celulele nervoase ale indivizilor morți de turbare, corpusculii Babeș - Ernst în bacilii difterici, iar în cercetările sale asupra antagonismului bacterian a anticipat descoperirea antibioticelor. A studiat numeroase boli infecțioase. Este creatorul Institutului „Victor Babeș" din București și organizatorul primelor laboratoare de igienă și bacteriologie.

IOAN CANTACUZINO (1863 - 1936), format în laboratorul condus de Mecinikov la Institutul Pasteur din Paris, a continuat cercetările maistrului său privind imunitatea nevertebratelor. A studiat patogenia holerei, tuberculozei și altor boli, vaccinul și vaccinarea anitholerică. Rămâne în istoria științei românești mai ales prin *școala contemporană de microbiologie* pe care a creat-o și dezvoltat-o, inițial în laboratorul de Medicină Experimentală al Facultății de Medicină din București, apoi în Institutul de Cercetări Microbiologice pe care l-a fondat în 1921 și care-i poartă astăzi numele. Profesorul Ioan Cantacuzino este acela care a elaborat *prima lege sanitară* în țara noastră.

Opera acestor doi mari savanți români în domeniul Microbiologiei a fost continuată și amplificată de alți savanți de reputație internațională: **Constantin Levaditi, Dumitru Combiescu, Constantin Ionescu - Mihăești,**

Ştefan S. Nicolau, Mihai Ciucă, Lidia Mesrobeanu şi alţii. Astăzi această activitate se desfăşoară în continuare în special în cele două mari institute de profil din ţara noastră: Institutul de Microbiologie „I. Cantacuzino" şi Institutul de Virusologie „Şt. S. Nicolau" de la care provin doi academicieni de renume internaţional: Profesor **G. Zarnea,** autorul Tratatului de Microbiologie Generală, apărut în cinci volume la Editura Academiei Române (1983 - 1994) şi fondatorul Catedrei de Microbiologie a Facultăţii de Biologie din Bucureşti şi Profesorul **N. Cajal,** sub redacţia căruia a apărut Tratatul de Virusologie Medicală în Editura Medicală (1990). Profesorul G. Zarnea, nume de referinţă pentru Microbiologia din România a format şi continuă să formeze generaţii de studenţi şi doctoranzi în specialitate, fiind coordonator şi consultant al programelor de cercetare microbiologică ale colectivelor de profil din diferite institute şi universităţi.

Microbiologia continuă să progreseze în fiecare an cu ajutorul a noi tehnici, noi date furnizate de cercetare şi noi aprofundări asupra microorganismelor şi activităţii lor.

În perioada de după 1910, din totalul premiilor Nobel pentru Medicină şi Fiziologie peste o treime au fost acordate microbiologilor şi specialiştilor în discipline înrudite. Din rezultatele acestor oameni de ştiinţă şi a multor altora a devenit evident că multe descoperiri provocatoare şi semnificative în domenii ca agricultura, biochimia, genetica, medicina, biologia moleculară, farmacologia şi fiziologia se bazează pe cunoaşterea microorganismelor şi aplicarea principiilor şi tehnicilor microbiologice.

Microbiologia în tranziţie

Din analiza cercetărilor de microbiologie realizate în ultimul deceniu se poate constata că microorganismele sunt în prezent studiate tot mai mult fie din motive practice (de natură medicală, bioindustrială, agricolă şi de mediu) sau ca vehicule necesare pentru rezolvarea diverselor probleme de abordat la nivel molecular (ca sisteme uşor de manipulat în analiza moleculară, biochimică şi ca sisteme pentru clonare, secvenţializare şi exprimare a genelor). Există astfel pericolul, recent sesizat, de abatere a preocupărilor Microbiologiei de la studiul diversităţii microbiene şi de la studiul microorganismelor ca entităţi cu statut propriu, acordat corect, pe măsura rolului central pe care microorganismele îl

joacă în ordinea naturală a lucrurilor. La baza acestui pericol se află după părerea unor specialiști de renume o absență a unui concept asupra microorganismelor, bine conturat și susținut de către microbiologi. Până la sfârșitul anului 1970, limitările tehnologice au împiedicat microbiologii să determine relațiile naturale (evolutive) între bacterii și să studieze aceste relații în habitatul natural.

Dificultățile în elaborarea acestui concept sunt în curs de a fi depășite, ele fiind reprezentate de limitările tehnologiei necesare determinării relațiilor naturale (evolutive) între microorganisme și studiul acestor relații în habitatul natural.

În prezent Microbiologia este marcată de procesul dezvoltării unui ***concept de bacterie*** plin de sens, bazat pe cunoașterea relațiilor naturale între diferite specii și pe o nouă abordare a ecologiei microorganismelor.

Relațiile naturale în cadrul procariotelor au început să fie stabilite numai odată cu caracterizarea lor la nivel molecular, în particular în termeni de secvențe și structuri moleculare pe baza cărora pot fi trase unele concluzii demne de încredere.

Pe baza acestei abordări moleculare a ieșit la iveală o incredibilă diversitate filogenetică a procariotelor față de care animalele și plantele par strâns înrudite. Lumea procariotelor, pe care biologii o considerau filogenetic coerentă, în realitate nu este așa. Există două grupe de procariote: Bacteria și Archaea care nu prezintă înrudiri mai mari una cu cealaltă, decât cu Eucarya. De fapt, Archaea sunt rudele specifice ale Eucaryotelor. (Fig. 4).

Dispunând în fine de un cadru filogenetic, în curs de clarificare, Microbiologia se poate dezvolta în prezent în sensul unei științe biologice complete, marcată de un spirit nou și comparabilă din acest punct de vedere cu biologia plantelor și animalelor.

În acest cadru comparativ filogenetic, noile izolate de microorganisme din mediu reprezintă piese într-un frumos și interesant „mozaic evolutiv" în curs de dezvoltare.

Pentru specialistul în ecologia microorganismelor, ceea ce poate fi cultivat în laborator stă la baza concepției sale despre ceea ce există în natură, ori tehnica de îmbogățire a culturilor care a reprezentat izvorul Microbiologiei mai bine de un secol, nu poate furniza singură date reale privind diversitatea și numărul de microorganisme existente în orice nișă particulară a mediului natural.

Un număr impresionant de noi genuri, familii, ordine, etc. de procariote au fost cultivate în cursul ultimului deceniu și există desigur multe microorganisme în natură încă nedetectate.

Cercetările ultimului deceniu au condus la ideea că, dat fiind un cadru filogenetic, este suficientă izolarea numai a uneia sau mai multor gene microbiene direct din mediu în locul microorganismului ca atare. De exemplu, determinând secvențele genelor ARNr, dintr-o nișă putem spune ce tip filogenetic („filotip") ocupă nișa respectică. Din aceste secvențe ARNr pot fi obținute sonde ADN specifice (mici porțiuni de ADN cu secvență nucleotidică unică pentru o specie sau gen) care permit identificarea microscopică a microorganismelor corespunzând secvențelor și permit de asemenea o determinare a numărului lor relativ. Pentru prima dată în prezent, microorganismele nu-și mai pot ascunde identitatea sau să scape detectării, astfel încât devine posibilă determinarea cantitativă și calitativă a unei nișe microbiene.

Deși microbiologii au descoperit o bogată diversitate a microorganismelor utilizând metoda clasică a cultivării prin îmbogățire (dezvoltată de Beijerinck acum aproximativ un secol), ei sunt departe de a epuiza această bogăție, șanse mari în acest scop oferind tehnicile directe de caracterizare filotipică a unei nișe (extrăgând gene, nu organisme). Deocamdată, metoda izolării directe a genei are dezavantajul că nu identifică fenotipul real (efectiv) al organismului din care provine gena. Ea prezintă însă, în compensație următoarele avantaje: ◆ ne spune ce organisme caracterizate fenotipic sunt înrudite cu un organism neizolat (și cât de strânse sunt aceste înrudiri); ◆ ne permite să realizăm sonde / primeri care direcționează către efortul de a izola organismul în chestiune prin culturi îmbogățite și ◆ are potențialul unei enumerări complete a speciilor de microorganisme existente într-o nișă (exceptând poate organismele care apar la nivele de densitate relativ scăzute).

Metoda caracterizării filotipice exhaustive a unei nișe, este într-un sens real, complementul metodei cultivării pe medii de îmbogățire.

Cele două abordări dau posibilitatea microbiologilor de a defini, înțelege și revela lumea microorganismelor în deplina sa bogăție și diversitate.

În felul acesta, datele acumulate în ultimul deceniu și opiniile unor microbiologi contemporani, exprimate recent (Woese, 1994), prefigurează ivirea unei Microbiologii, pe baze filogenetice.

Datorită utilizării în tot mai mare măsură a metodelor de apreciere a înrudirii genetice (hibridare ADN/ADN și ADN/ARN, catalogarea oligonucleotidelor ARNr și secvențializarea proteinelor), informația filogenetică a sporit, însă este încă fragmentară, nu toate grupele au fost analizate, iar interpretarea datelor nu este stabilită cu claritate.

În volumul de față, fără a neglija conturarea acestei perspective (filogenetice, moleculare)luăm în considerație conceptele fundamentale ale Microbiologiei și aplicațiile lor, care întrunesc acordul majoritar al comunității actuale a microbiologilor.

BACTERII

Conceptul de bacterie

Denumirea de **bacterie** (gr. <bakterion> = bastonaș) a fost introdusă în 1838 de EHRENBERG, care a descris și individualizat 41 specii de microorganisme, creind denumiri de gen folosite și astăzi (*Bacterium, Spirillum, Spirochaeta*), fără ca să stabilească o deosebire de natură între protozoare și bacterii. Bacteriile reprezintă o categorie aparte de organisme unicelulare a căror identitate a fost stabilită de F. COHN în perioada 1850 - 1875.

Deși bacteriile au fost bine cunoscute încă de mult timp, abia în perioada anilor 1960 au apărut primele încercări de definire a lor la nivel conceptual. Această întârziere se datorește faptului că în general bacteriile au un aspect morfologic caracteristic (Fig. 7), dimensiunile încadrate între anumite limite (Fig. 2) și caractere de colorabilitate ușor de stabilit, astfel încât pe baza unei experiențe, prin observații microscopice pot fi recunoscute. Dificultățile intervin ulterior în stabilirea exactă a tipului de bacterii.

Pe măsură ce prin perfecționarea tehnicilor, a fost evidențiată o varietate de particularități diferite în cadrul grupului, a devenit necesară stabilirea unor caractere care să ne permită să spunem despre un microorganism că este cu certitudine o bacterie. Astfel, a devenit necesară definirea bacteriilor la nivel conceptual.

Până în anul 1970 nu a existat un cadru conceptual pentru definirea bacteriilor, acesta fiind oferit de R.Y. STANIER printr-o încercare care a dat posibilitatea altor cercetători de a-l dezvolta în continuare, inclusiv cu date de biologie moleculară. Pornind de la observația că lumea bacteriilor are o organizare celulară de tip procariot, Stanier propune stabilirea cadrului conceptual printr-o antiteză între procariote și eucariote. El se baza pe

evidențierea caracterelor discriminatorii (fundamental distinctive) ale lumii bacteriilor prin compararea cu celulele eucariote. De la definirea inițială a procariotelor (bacterii) prin lipsa (absența) caracteristicilor care definesc eucariotele (o definiție „negativă") s-a ajuns în prezent la posibilitatea definirii „pozitive", pe baza caracterelor moleculare pe care le au în comun.

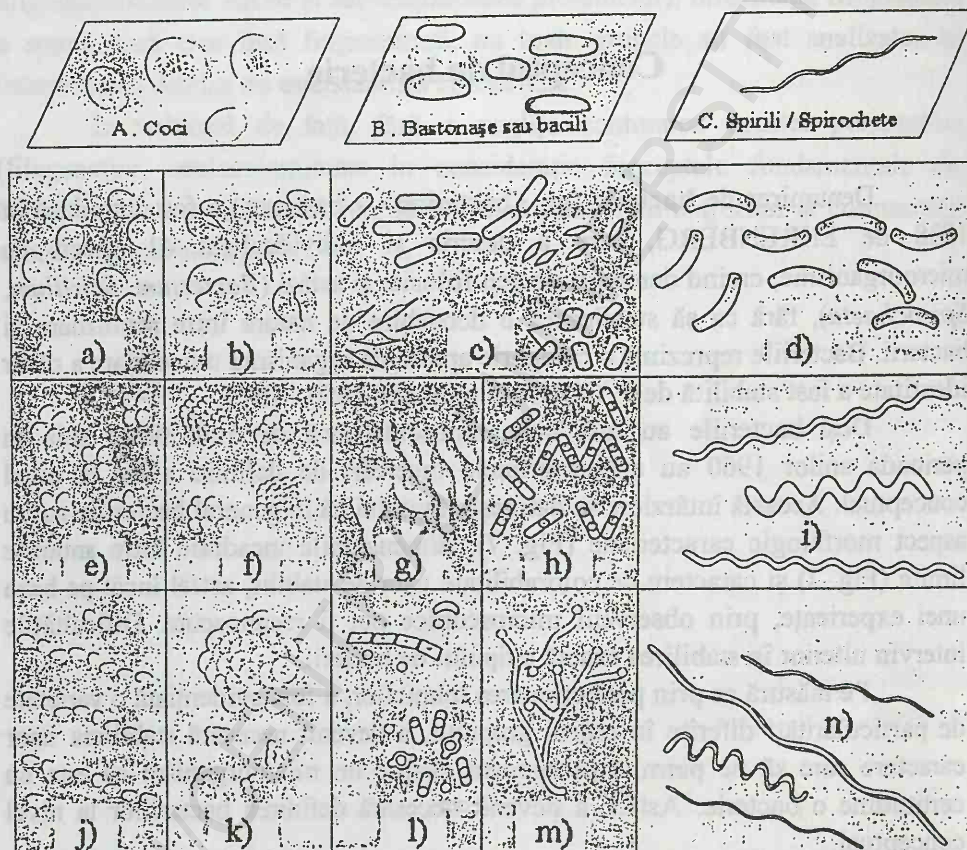


Fig. 7. Tipuri morfologice obișnuite pentru bacterii, cu exemple specifice pentru anumite grupuri: a) diplococi (coci în perechi); b) neiserii (celule perechi în formă de boabe de cafea); c) cocobacili; d) vibrioni (bacili incurbați); e) tetrade (coci în pachete de câte 4); f) sarcine (coci în pachete de 8, 16, 32 celule); g) micobacterii; h) corinebacterii; i) spirili; j) streptococi (coci în lanțuri); k) micrococi - stafilococi (grupuri de coci); l) bacili formatori de spori; m) streptomicete (bacterii filamentoase, asemănătoare cu mucegaiurile); n) spirochete.

Unele caracteristici semnificative care diferențiază procariotele de eucariote sunt trecute în Tabelul 4.

Tabelul nr. 4

Caracteristici diferențiale între procariote și eucariote[a].

Caracteristica	Procariote (Bacterii)	Eucariote
1	2	3
TRĂSĂTURI CITOLOGICE		
- Nucleoplasma separată de citoplasmă printr-o membrană (membrană nucleară)	-	+
- Valoarea dimensiunii celei mai mici a celulelor (lățime sau diametru): obișnuit 0,2-2,0 µm	+[b]	-
obișnuit >2,0 µm	-	+
- Mitocondrii prezente	-	+
- Cloroplaste prezente la fototrofe	-	+
- Vacuole cu gaz prezente[c]	D	-
- Aparat Golgi prezent	-	D
- Lizozomi prezenți	-	D
- Sistem microtubular prezent	-[d]	D
- Reticul endoplasmic prezent	-	+
- Localizarea ribosomilor:		
Dispersați în citoplasmă	+	-
Atașați de un reticul endoplasmic	-	+
- Curenți citoplasmatici, mobilitate prin pseudopode, endocitoză și exocitoză	-	D
- Diviziunea celulară acompaniată de modificări ciclice în textura sau proprietățile tinctoriale ale nucleoplasmei sau citoplasmei	-	+
- Flagelii, dacă sunt prezenți:		
Diametrul: 0,01-0,02 µm	+	-
cca. 0,2 µm	-	+
În secțiune transversală au un aranjament caracteristic „9+2" al microtubulilor	-	+
- Endospori prezenți[e]	D	-
TRĂSĂTURI BAZATE PE ANALIZĂ CHIMICĂ		
- Poli-β-hidroxibutirat (sub formă de compus de rezervă în incluziuni citoplasmatice)	D	-
- Acizi teichoici prezenți (în peretele celular)	D	-
- Acizi grași polinesaturați posibil prezenți (în membrane)	rareori	comun

(Tabelul 4 continuare)

1	2	3
- Acizi grași izo- sau anteizo cu lanț ramificat prezent (în membrane)	comun	rareori
- Prezența sterolilor sau fosfatidil-colinei (în membrane)	-[f]	comun
- Prezența nucleosomilor și a histonelor în nucleosomi	-	+
- Acid diaminopimelic prezent (în peretele celular)	D[g]	-
- Acid muramic prezent (în peretele celular)	D[h]	-
- Peptidoglican prezent în pereții celulari	D[h]	-
NUTRIȚIE		
- Nutrienții sunt dobândiți de către celule sub formă de molecule mici solubile; pentru a servi ca surse de nutrienți, materia particulată sau moleculele mari trebuie mai întâi să fie hidrolizate la molecule mai mici de către enzime din exteriorul membranei plasmatice (exoenzime)	+	D
TRĂSĂTURI METABOLICE		
- Funcțiile respiratorii și de fotosinteză ca și pigmenții plus enzimele asociate (ex.: clorofile, citocromi), dacă sunt prezente, sunt asociate cu membrana plasmatică și invaginările acesteia	+[i]	
- Tip de metabolism chemolitotrof (compușii anorganici pot fi utilizați ca donori de electroni de către organismele care își procură energia din compuși chimici)	D	-
- Capacitatea de a fixa N_2	D	-
- Capacitatea de a dezasimila NO_3^- la N_2O sau N_2	D	-
- Metanogeneză	D	-
- Capacitatea de a realiza fotosinteză anoxigenică	D	-
TRĂSĂTURI ENZIMATICE		
- Tipul de superoxiddismutază:		
Tip Cu - Zn	-[j]	+
Tip Mn și/sau Fe	+	-[k]
TRĂSĂTURI DE REPRODUCERE		
- Diviziunea celulară prin mitoză și este prezent un sistem microtubular (fus)	-	+
- Meioza prezentă	-	D
- Mecanismele de transfer genetic și recombinare, dacă există, implică: gametogeneza și formarea zigotului;	-	+
contribuția inegală a celulelor participante cu formarea unui merozigot (mecanisme de proto- sau parasexualitate)	+	-

(Tabelul nr. 4 continuare)

1	2	3
PROPRIETĂŢI BIOLOGICE MOLECULARE		
- Numărul de cromozomi prezenţi per nucleoid/nucleu	obişnuit 1	obişnuit>1
- Cromozomi circulari	+	-[l]
- Cromozomi lineari	-[m]	+
- Înscrierea informaţiei genetice la nivelul cromozomului:		
Discontinuitatea genelor (introni şi exoni)	-	+
Colinearitatea genelor (absenţa intronilor în gene pentru proteine)	+[n]	-
- Transcrierea genetică este cuplată cu traducerea la proteine (în citoplasmă)	+	-
- Constanta de sedimentare a ribosomilor:		
70 S	+	-[o]
80 S	-	+
- Constanta de sedimentare a ARN ribosomal:		
16 S; 23 S; 5 S	+	-
18 S; 28 S; 5,85 S; 5 S	-	+
- Primul aminoacid iniţiator al unui lanţ polipeptidic în cursul sintezei proteinelor:		
Metionina	D	+
N - Formil-metionina	D	-
- Situsul de legare al ARN mesager la AUCACCUCC de la capătul 3 al ARN ribosomal 16 S sau 18 S	+	-
SUSCEPTIBILITATEA LA ANTIBIOTICE		
- Susceptibil la:		
Penicilină, streptomicină sau alte antibiotice specifice pentru procariote	D	-
Cicloheximidă sau alte antibiotice specifice ptentru eucariote	-	D
MECANISME DE INFECTARE A CELULEI CU VIRUSURI		
- Injectarea numai a genomului viral	+	-
- Endocitoză sau alte mecanisme	-	D

[a] Simboluri: +, pozitiv; -, negativ; D, diferă între organisme.

[b] Un număr mic de bacterii (de ex. anumite treponeme, micoplasme, *Haemobartonella*) pot avea o lăţime de 0,1 µm; un număr mic de bacterii (de ex. *Achromatium, Macromonas*) pot avea o lăţime mai mare de 10 µm.

[c] Vacuolele cu gaz nu sunt înconjurate de o membrană propriu-zisă. Veziculele care compun vacuolele pot dispare sub acţiunea bruscă a presiunii hidrostatice - o trăsătură esenţială pentru identificarea lor.

[d] Totuși anumite fibrile intracelulare care pot fi microtubuli au fost relatate la *Spiroplasma*, anumite spirochete, cianobacteria *Anabaena* și la formele L bacteriene.

[e] Endosporii bacterieni sunt obișnuit rezistenți la un tratament cu temperatură de 80° C timp de 10 minute, totuși unele tipuri de endospori pot fi omorâți în aceste condiții și pot necesita testări la temperaturi mai scăzute.

[f] Exceptând în membranele majorității micoplasmelor.

[g] Prezent la toate eubacteriile Gram-negative și la multe bacterii Gram-pozitive.

[h] Prezent la eubacteriile cu perete celular exceptând chlamidiile; absent la archaebacterii.

[i] La cianobacterii poate exista o independență a membranei citoplasmatice și membranelor tilacoidale.

[j] Cu puține rare excepții, cum sunt anumite fotobacterii.

[k] Exceptând în mitocondrii, în care apare tipul Mn.

[l] În organite (mitocondrii și cloroplaste) informația genetică este structurată sub formă de molecule de ADN dublucatenar, circular, închis întocmai cromosomului circular de la bacterii, ceea ce constituie un argument pentru teoria endosimbiotică a evoluției.

[m] Cu unele excepții de bacterii la care în ultimii ani s-a descris un cromozom liniar.

[n] Exceptând în mitocondrii și cloroplaste, care au ribozomi 70 S (alt argument în sprijinul teoriei endosimbiotice a evoluției).

[o] In 1989 - 1990 s-a demonstrat prezența intronilor în gena ARNt la 7 specii de cianobacterii și înrudirea lor cu intronii genelor cloroplastelor.

Bacteriile (procariotele) pot fi caracterizate ca formând un grup de microorganisme definit esențial prin proprietăți celulare și moleculare, nu de organism.

În termeni de organism, bacteriile sunt predominant microorganisme **unicelulare**, pot apare însă și sub formă filamentoasă, miceliană sau coloniale. Agregatele coloniale sunt formate din celule identice între care pot exista interacțiuni simple, rudimentare, de tip nutrițional, fiecare celulă păstrându-și identitatea perfect.

Spre deosebire de eucariote, la care diferențierea celulelor culminează la organismele animale superioare cu apariția neuronilor, bacteriile sunt incapabile de diferențiere cu unele excepții. aceste excepții includ o diferențiere limitată la formarea sporilor, a unor structuri de tipul pedunculilor, crampoanelor și a unor celule cu modificări morfologice în cursul ciclului biologic.

Se consideră că: între procariote și eucariote lipsește o legătură reală evolutivă și că evoluția ulterioară a eucariotelor depinde mai degrabă de agregarea, diferențierea și specializarea celulelor decât de vreo modificare radicală a modelului celular. De aceea drojdiile, ca microorganisme eucariote, sunt considerate celule model de eucariote, studiul lor permițând extrapolări la organismele superioare.

Bacteriile (procariotele) formează deci o lume aparte, cu un cadru propriu de evoluție în natură și care poate fi caracterizată prin particularitățile menționate în Tabelul 4.

Structurile celulelor bacteriene și semnificația lor biologică

Structura celulei bacteriene a fost decifrată în timp, odată cu punerea la punct a tehnicilor de citochimie (care colorează selectiv anumite structuri) și cu perfecționarea metodelor de microscopie electronică (de examinare a bacteriilor în secțiuni ultrafine). Aceste două categorii de tehnici au demonstrat că celulele bacteriene nu sunt așa cum se considera la început, ca niște saci cu enzime, lipsite de structură internă sau ca niște structuri cu un conținut omogen (lipsite de nucleu sau structuri reprezentate numai de un nucleu foarte mare). Această din urmă idee a fost rezultatul utilizării coloranților de anilină care colorează omogen celula bacteriană (datorită conținutului mare de ARN citoplasmatic).

Colorațiile selective au pus în evidență la microscopul optic, diferite structuri intracelulare, iar studiile de microscopie electronică au evidențiat o ultrastructură destul de complicată și încă mai evidențiază diferite structuri și detalii de structură la diferite bacterii.

Pe de altă parte, date mai recente arată că celulele bacteriene nu sunt entități la fel de statice ca celulele eucariote, deoarece bacteriile cresc și se divid într-un ritm foarte rapid. În perioada creșterii, până la diviziune, celula evoluează într-un adevărat ciclu celular în cursul căruia distribuția spațială a macromoleculelor în celulă se schimbă de mai multe ori. Ca urmare, particularitatea fundamentală a anatomiei fine bacteriene este aceea că morfologia ultrastructurală a celulei bacteriene nu poate fi studiată fără suport biochimic (molecular). Datorită acestei particularități și datorită faptului că

metodele de microscopie electronică sunt uneori brutale (provocând reorganizarea macromoleculelor, coagulări), unele dintre structurile descrise au devenit discutabile și s-a recurs la modalități de examinare microscopică de performanță ca putere de rezoluție, dar netraumatizante.

În același timp, răspândirea ubicvitară și persistența bacteriilor într-o varietate de habitate începând cu 3,5 bilioane de ani în urmă, reflectă faptul că structura și funcția celulei bacteiene sunt uimitor de adaptative.

O analiză a organizării celulare a unei celule procariote ne furnizează un model general corespunzând următoarelor tipuri de structuri: **anvelopa celulară (învelișul celular), apendice** de diferite categorii și **protoplasma**.

Prezentatrea în continuare a structurilor celulei bacteriene, exceptând notațiile aparte, se referă la *eubacterii,* bacteriile tipice care au **peptidoglican** în peretele celular. Luând ca reper **peretele celular**, unul din straturile care alcătuiesc anvelopa celulară, structurile celulei bacteriene pot fi împărțite în ***structuri intraparietale*****: membrana plasmatică, mezozomii, citoplasma, nucleoidul și plasmidele, ribozomii, incluziunile, endosporul** și ***structurile extraparietale*****: glicocalixul (capsula, stratul mucos), flagelii, pilii** și **fimbriile**. Celula bacteriană are o structură relativ complexă în raport cu dimensiunile ei, deși nu toate structurile menționate sunt prezente la o singură (aceeași) celulă bacteriană. Unele structuri sunt esențiale și sunt prezente în mod invariabil la toate celulele bacteriene, în timp ce altele nu sunt componente universale ale tuturor bacteriilor, sau sunt structuri accesorii (pot fi prezente în anumite stadii sau pot lipsi fără să afecteze existența celulei).

În general, evidențierea și studiul structurilor bacteriene corespund bacteriilor obținute în culturi pure, în laborator, respectând anumite condiții de cultivare. S-a constatat că unele structuri apar numai la bacteriile existente în mediile naturale.

Majoritatea cunoștințelor asupra structurilor descrise în continuare provin din studii la microscopul electronic. Deși fotomicrografiile structurilor celulare au un aspect bidimensional, este de reținut că aceste structuri au o configurație tridimensională. Fig. 8 prezintă alături de o reprezentare schematică a structurii generalizate a unei celule bacteriene pe cale de a se divide (A), contrastul dintre anatomia tridimensională a unei asemenea celule, în formă de bastonaș (B) și microelectronografia unei celule reale (C).

Analiza principalelor trăsături anatomice ale unei asemenea celule bacteriene va începe cu peretele celular, continuând cu structurile intraparietale și cele extraparietale.

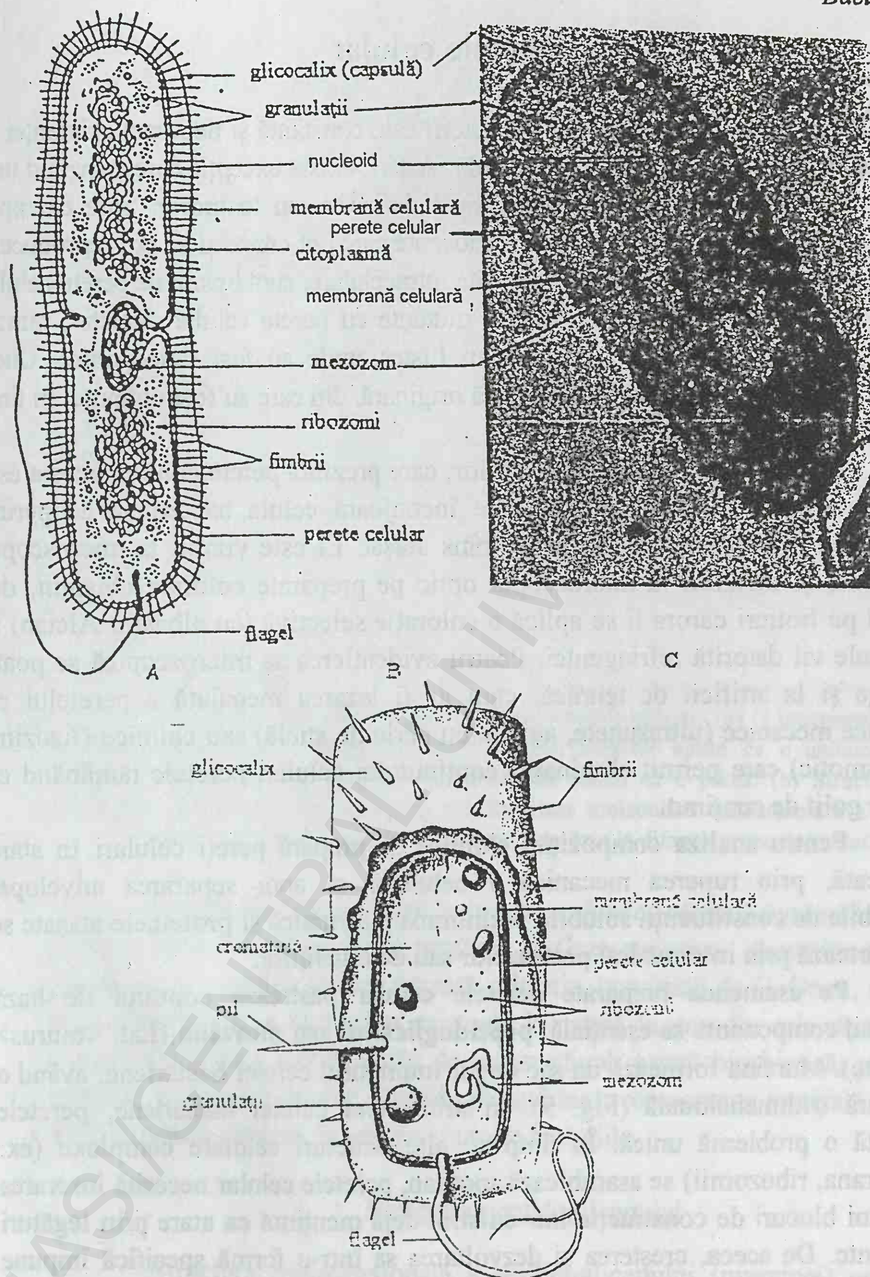


Fig. 8. Trăsăturile ultrastructurale ale unei celule bacteriene generalizate. A - reprezentare schematică în secțiune longitudinală; B - aspect tridimensional; C - microelectronografie prin transmisie a unei celule reale (x 50000).

Peretele celular

Prezența peretelui celular la bacterii este constantă și necesară existenței lor în condiții naturale, dar nu este universală. Astfel, există excepții corespunzând unor bacterii la care peretele celular poate lipsi definitiv sau temporar. Spre exemplu, micoplasmele, cele mai mici bacterii cunoscute care pot crește și se pot reproduce în afara celulelor gazdă vii, deși sunt parazite intracelulare, sunt lipsite de perete celular. De asemenea, sunt cunoscute bacterii mutante cu perete celular defectiv, numite forme „L" (de la denumirea Institutului Lister, unde au fost descoperite). Unele forme „L" pot reveni la forma bacteriană originară, din care au fost obținute, în timp ce altele sunt stabile.

La marea majoritate a bacteriilor, care prezintă perete celular, acesta este o structură bine definită, rigidă, care înconjoară celula bacteriană acoperind membrana plasmatică de care este strâns atașat. El este vizibil la microscopul electronic și invizibil la microscopul optic pe preparate colorate obișnuit, dar vizibil pe frotiuri cărora li se aplică o colorație selectivă (cu albastru Alcian) și pe celule vii datorită refringenței. Pentru evidențierea sa microscopică se poate recurge și la artificii de tehnică, cum ar fi lezarea menajată a peretelui cu mijloace mecanice (ultrasunete, agitare cu perle de sticlă) sau chimice (lizozim, șoc osmotic) care permit eliminarea conținutului celular, peretele rămânând ca un sac golit de conținut.

Pentru analiza compoziției chimice se prepară pereți celulari în stare purificată, prin ruperea mecanică a celulelor și apoi separarea anvelopei insolubile de constituenții solubili. Membrana plasmatică și proteinele atașate se îndepărtează prin intermediul proteazelor sau detergenților.

Pe asemenea preparate peretele celular păstrează conturul de bază relevând componenta sa esențială: **peptidoglicanul** sau **mureina** (Lat. <murus> = perete). Mureina formează un sac de jur împrejurul celulei bacteriene, având o structură tridimensională (Fig. 9). În arhitectura celulei bacteriene, peretele prezintă o problemă unică. În timp ce alte structuri celulare complexe (ex: membrana, ribozomii) se asamblează spontan, peretele celular necesită inserarea unor noi blocuri de construcție într-un strat deja menținut ca atare prin legături covalente. De aceea, creșterea și dezvoltarea sa într-o formă specifică impune existența unui mecanism cu reglare de mare finețe în ceea ce privește deschiderea și închiderea enzimatică a legăturilor.

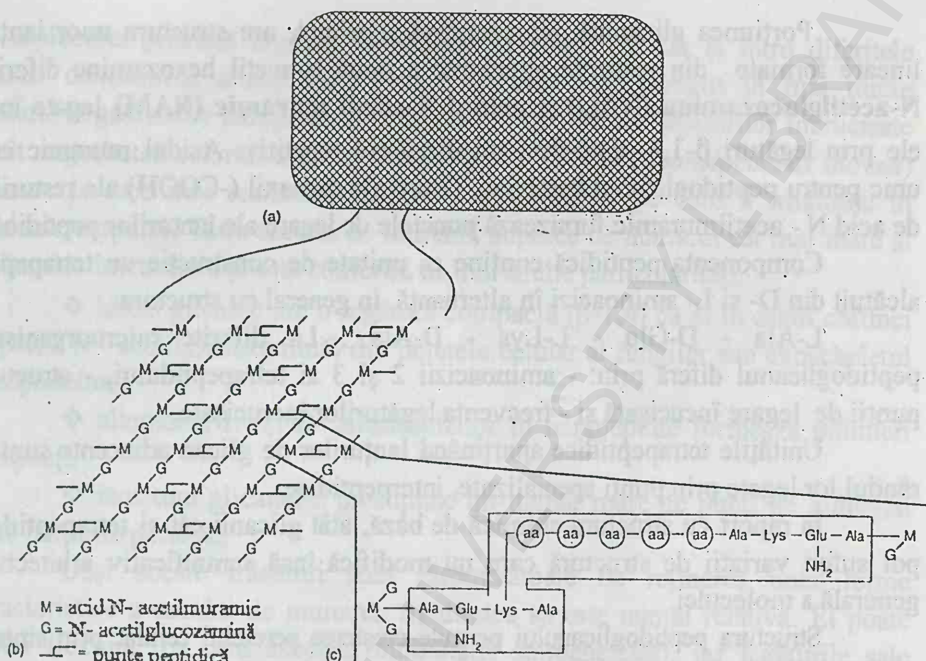


Fig. 9. Structura generală a peptidoglicanului din peretele celular. (a) O interpretare artistică a rețelei de peptidoglican, nerespectând proporțiile. Peretele apare ca o unitate moleculară continuă și uneori multistratificată ce înconjoară celula ca o plasă. (b) Structura la nivel molecular a rețelei de peptidoglican. (c) Structura moleculară fundamentală a unei punți încrucișate peptidice care variază ca exactitate la diferite grupe de bacterii.

Deosebirile cela mai nete în *structura chimică globală a peretelui celular* se constată între bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative, denumite astfel după reacția lor la colorația Gram. Această colorație, imaginată de C. Gram, diferențiază imensa majoritate a bacteriilor existente în natură în una din cele două categorii, corespunzând unor particularități de tip structural, natură biochimică, patogenitate, structură antigenică diferite. Peptidoglicanul însă, componenta esențială a peretelui, are o structură similară, în general, la toate bacteriile.

Structura peptidoglicanului

Structura tridimensională a peptidoglicanului (mureinei) este formată din punct de vedere chimic dintr-un **heteropolimer** alcătuit din două componente: **peptidică** și **glicanică**.

Porţiunea glicanică, reprezentând scheletul, are structura unor lanţuri lineare formate din resturile alternante a două N-acetil hexozamine diferite: **N-acetilglucozamina (NAG) şi acidul N-acetil muramic (NAM)** legate între ele prin legături β-1,4. Este deci un dizaharid repetitiv. Acidul muramic este unic pentru peptidoglicanul bacterian. Grupările carboxil (-COOH) ale resturilor de acid N - acetilmuramic furnizează punctele de legare ale lanţurilor peptidice.

Componenta peptidică conţine ca unitate de construcţie un tetrapeptid alcătuit din D- şi L- aminoacizi în alternanţă, în general cu structura:

L-Ala - D-Glu - L-Lys - D-Ala . La diferite microorganisme peptidoglicanul diferă prin: - aminoacizii 2 şi 3 ai tetrapeptidului, - structura punţii de legare încucişată şi - frecvenţa legăturilor încrucişate.

Unităţile tetrapeptidice aparţinând lanţurilor de glican adiacente sunt la rândul lor legate prin punţi specializate, interpeptidice.

În raport cu structura chimică de bază, atât glicanii cât şi tetrapeptidele pot suferi variaţii de structură care nu modifică însă semnificativ arhitectura generală a moleculei.

Structura peptidoglicanului permite creşterea peretelui celular prin sinteza mureinei sub acţiunea enzimelor mureinsintetaze. Mureinhidrolazele, existente în peretele celular, desfac legătura peptidoglicanică iar mureinsintetazele introduc molecule noi la locul rupturilor. Printr-un mecanism similar de rupere a legăturilor acţionează lizozimul (muramidaza, o mureinhidrolază) şi penicilina. Morfogeneza peretelui implică modificări complexe ale sintezei peptidoglicanului, cu reacţii hidrolitice ca şi de polimerizare, reglate în spaţiu ca şi în timp. Progrese în înţelegerea acestor reacţii au fost realizate utilizându-se diferite mureinhidrolaze, enzime autolitice şi penicilina.

Structura peptidoglicanului a fost rezolvată cu ajutorul enzimei lizozim (obţinută obişnuit din albuşul de ou, prezentă şi în lichidele corpului), care, hidrolizează o punte glicozidică specifică din lanţul de glican, producând dizaharidul NAG - NAM ce poartă diferiţi substituenţi. Din diferite alte surse (în special melc) au fost obţinute enzime bacteriolitice specifice pentru alte legături, cu ajutorul cărora pot fi obţinute o varietate de alte fragmente. Identificarea compuşilor obţinuţi pe cale enzimatică şi a intermediarilor de biosinteză acumulaţi relevă structura.

Întregul peptidoglican al celulei bacteriene este o moleculă gigantă cu legături covalente, numită *murein sacculus* (în formă de sac). Lanţurile de glican

ale moleculei prezintă legături încucișate atât între ele cât și între diferitele straturi concentrice atunci când peptidoglicanul este prezent în mai multe straturi. Organismele patogene au o frecvență mai mare a legăturilor încrucișate decât majoritatea celorlalte specii (de exemplu: 75% la *Staphylococcus aureus*) ceea ce le face mai rezistente la liză prin lizozimul pe care îl întâlnesc în lichidele corpului. Tăria sacului de mureină depinde de numărul cât mai mare al legăturilor încrucișate și este conferită de mai multe particularități:

❖ lanțul glicanic are o legătură compactă (β-1,4) ca și în cazul chitinei (o poli - N - acetilglucozamină) din peretele celular al fungilor sau exoscheletul artropodelor,

❖ alternanța L- și D- aminoacizilor în tetrapeptide formează polimeri compacți,

❖ structura glicanului presupune un număr mare de punți de hidrogen între lanțurile paralele.

Deși aceste trăsături sunt răspunzătoare de reținerea unei forme caracteristice a sacului de mureină, rigiditatea sa este numai relativă. El poate suferi flexiuni (ca cele asociate mobilității spirochetelor), iar legăturile sale încrucișate flexibile, ca într-o țesătură extensibilă *(stretch)* permit mărirea și contractarea substanțială a volumului celulei bacteriene sub influența modificărilor de presiune osmotică.

Bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative

Pe lângă peptidoglican, peretele celular bacterian are în structura sa chimică și alți compuși care diferă cantitativ și calitativ la bacteriile Gram-pozitive față de bacteriile Gram-negative (Fig. 10).

Bacteriile Gram-pozitive au un perete celular gros (20 - 50 nm la microscopul electronic), relativ omogen, care conține: peptidoglican 80 - 90 % din greutatea sa (corespunzând la circa 20 straturi sau mai mult); proteine și polizaharide. Polizaharidele caracteristice sunt reprezentate de **acizii teichoici** (Gr. <teichos> = zid, perete). (Fig. 10). Acizii teichoici sunt molecule polimere, sub formă de lanțuri lungi și flexibile care ies la suprafață, formate din 1,5 - poli (ribitol - fosfat) și 1,3 - poli (glicerol - fosfat) cu diferiți substituenți (zaharuri, cholină, D - alanină) care furnizează specificitate. Există acizi teichoici legați de celule și acizi teichoici solubili, care pot fi excretați în cantități mari.

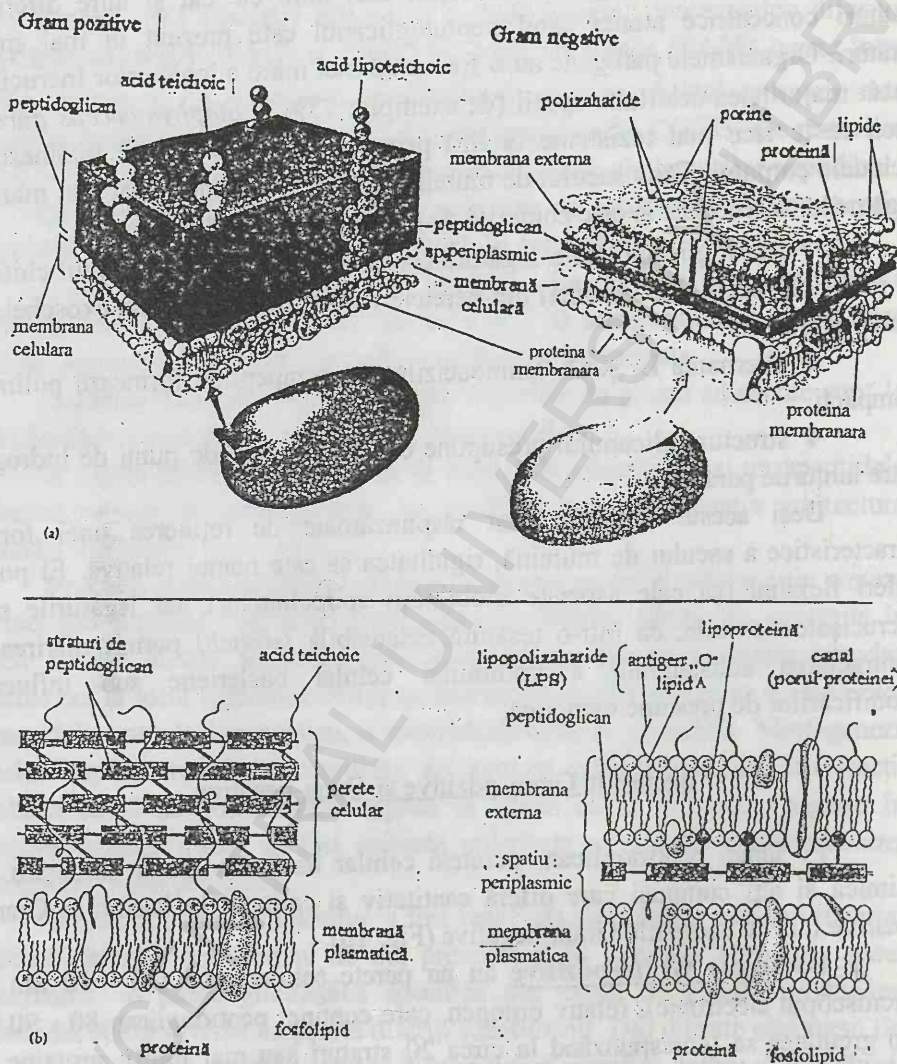


Fig. 10. Compararea structurii detaliate a peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative: (a) reprezentare tridimensională, (b) în secțiune longitudinală.

Acizii teichoici legați de celulă aparțin la două clase: 1) **acizii lipoteichoici** care traversează peptidoglicanul: având un capăt al lanțului legat de un glicolipid din membrana plasmatică, iar celălalt expus la exterior și care

sunt prezenți la toate bacteriile Gram-pozitive; 2) **acizii teichoici de perete**, prezenți la unele bacterii Gram-pozitive, care sunt atașați de resturile de NAM ale peptidoglicanului.

Rolul acizilor teichoici din peretele celular este multiplu:

* fac posibilă identificarea bacteriilor prin tehnici imunologice, furnizând specificitate antigenică;
* conferă peretelui celular un plus de rigiditate, iar în cazul bacteriilor patogene un plus de virulență, opunându-se procesului de fagocitoză;
* sunt implicați în transportul ionilor în și în afara celulei;
* unii pot funcționa ca receptori pentru bacteriofagi;
* pot juca un rol în diviziunea celulară.

Bacteriile Gram-pozitive pot conține în anumite cazuri straturi externe reprezentate de un polizaharid propriu-zis legat covalent (de exemplu: hidrocarbonatul C de la *Streptococcus*) sau de proteine (proteina M de la *Streptococcus*). Proteina poate forma un strat fibrilar sau o zonă cristalină bidimensională corespunzând uneori mai multor straturi.

Aceste straturi superficiale de proteine sau polizaharide au rol de adezine specifice fiind răspunzătoare de fenomenul de adeziune la suprafețe specifice.

* **Bacteriile Gram-negative** au un perete celular care conține numai 8 - 10 % peptidoglican din greutatea sa (corespunzând obișnuit unui singur strat) și nu conține acizi teichoici. În schimb, se caracterizează prin apariția unei structuri suplimentare, în comparație cu peretele celular al bacteriilor Gram-pozitive și anume: **membrana externă** (denumită așa prin contrast cu membrana citoplasmatică ce reprezintă membrana internă a celulei bacteriene) (Fig. 11).

Peretele celular al bacteriilor Gram negative este alcătuit astfel din două structuri majore: **- complexul peptidoglican - lipoproteină**, cu o grosime de 1,5 - 3,0 nm și **- membrana externă**, cu o grosime de 6 - 20 nm. În compoziția chimică a membranei externe a peretelui celular intră: fosfolipide (35%); proteine (15%) și lipopolizaharide (50%).

Fosfolipidele alcătuiesc dublul strat al membranei externe (ca și în cazul membranei plasmatice) în care sunt inclavate *proteine* și *lipopolizaharide* (LPS). LPS determină activitatea endotoxică și de patogenitate a bacteriei, unele proprietăți antigenice și sensibilitatea la fag.

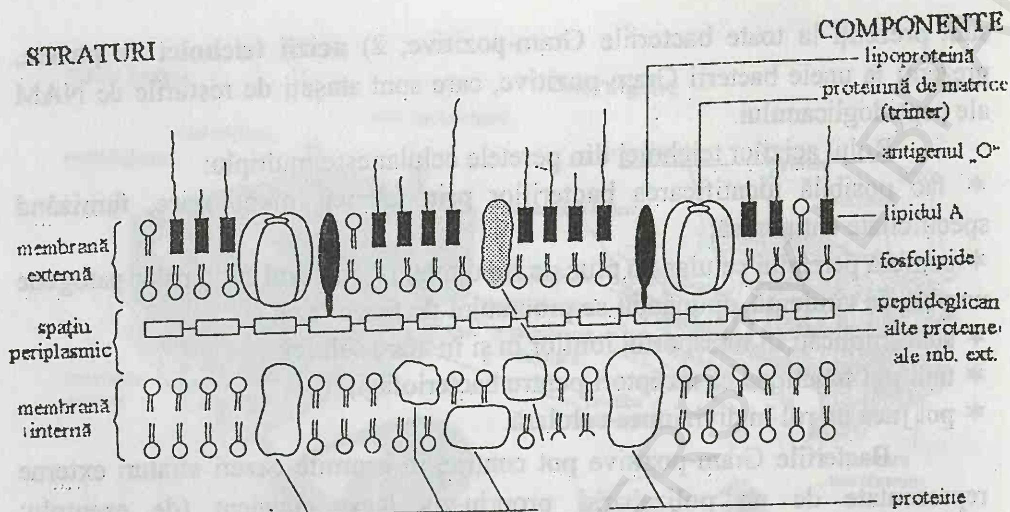


Fig. 11. Reprezentarea schematică a compuşilor şi straturilor anvelopei celulare la bacteriile Gram negative. Trimerii proteinei de matrice sunt asociaţi cu lipoproteina şi LPS, iar lipoproteina este asociată covalent de peptidoglican. Schema ilustrează şi unele proprietăţi ale membranelor.

Ca structură generală lipopolizaharidele sunt alcătuite din *lipidul A* şi *polizaharidul O* sau *antigenul O*. Lipidul A este inclus în membrană, în timp ce polizaharidul *O* este ataşat de acesta şi formează în exterior lanţuri specifice alcătuite din tri-, tetra-, pentazaharide, a căror lungime diferă chiar la acelaşi organism. Faţă de lipidul A care conţine constituenţi similari la diferite specii, polizaharidul este variabil ca structură şi compoziţie chimică fiind responsabil în mare parte de specificitatea antigenică a celulei.

Între membrana externă a peretelui celular şi membrana internă (membrana plasmatică a celulei) apare **spaţiul periplasmic** (Fig. 11). Membrana externă diferă ca organizare şi funcţionare de membrana internă (citoplasmatică) printr-o serie de particularităţi:

❖ În timp ce membrana internă este menţinută strâns ataşată de peretele celular prin presiunea turgor a protoplastului, retenţia membranei externe necesită ataşarea de peptidoglicanul aflat dedesubt. Această legare fermă a membranei externe de peptidoglican este condiţionată în primul rând de o lipoproteină mică (G.M. = 7000 Da) care este prezentă în aproximativ 250000 copii per celulă (*Escherichia coli*). Lipoproteina este legată covalent de aproximativ 1/10 din tetrapeptidele peptidoglicanului formând **complexul peptidoglican - lipoproteină**.

❖ În stratul intern al membranei externe (ca în ambele straturi ale membranei interne) lipidele principale sunt fosfatidele, în timp ce în stratul extern lipidele predominante sunt lipopolizaharidele (LPS).

❖Funcția majoră a membranei externe este de a furniza o sită moleculară care permite numai difuzia unor molecule relativ mici. Ea nu permite trecerea unor enzime (de exemplu: lizozim) care ar putea ataca peptidoglicanul, foarte susceptibil de altfel, pentru că se află într-un strat atât de subțire la bacteriile Gram negative.

❖ Unitățile de LPS asigură, prin existența în porțiunea lipidică a șase lanțuri de acizi grași, o coerență mai mare decât cea asigurată de cele două lanțuri ale fosfatidelor. În plus, toate lanțurile, în LPS, sunt saturate. Ca urmare, membrana externă este mai puțin fluidă decât membrana internă.

❖ Membrana externă mai coerentă este de asemenea mai puțin supusă alterării sau dizolvării sub acțiunea detergenților sau solvenților organici și mai puțin permeabilă pentru molecule hidrofobe, cum ar fi cele a numeroase antibiotice. Protecția rezultată față de atacul sărurilor biliare poate explica de ce bacteriile din intestinul superior sunt toate Gram-negative.

❖ Pe de altă parte, proteinele sistemului imunitar (anticorpii și complementul) pot ataca membrana externă, dar nu pot ajunge la membrana "internă" a bacteriilor Gram-pozitive. Deci prin acest mecanism sunt omorâte numai bacteriile Gram-negative.

❖ Gelurile electroforetice ale membranelor solubilizate relevă o mare varietate de proteine în membrana internă, corespunzând numeroaselor ei funcții. Prin comparație, această varietate este mai limitată în membrana externă.

Din categoria **proteinelor** caracteristice membranei externe, **porinele** sunt relevate la microscopul electronic sub formă de trimeri (g.m. = 35000 Da), fiecare subunitate prezentând un por cu diametrul de 1 nm. Porinele sunt legate necovalent de peptidoglican, prin această modalitate de atașare putând asigura continuarea canalului porinei în peptidoglican. Toți porii membranei externe transferă în cantitate suficientă molecule mici, însă trăsăturile specifice ale suprafeței porinei influențează rata de trecere a moleculelor mai mari. Un număr mic de porine manifestă o specificitate mult mai mare, furnizând *canale specifice* pentru substanțe care se întâlnesc în concentrație mică sau sunt prea mari pentru a trece prin porinele obișnuite, cum ar fi maltodextrina, diferiți chelatori de fier, vitamina B_{12}.

Unele dintre proteinele membranei externe servesc de asemenea ca receptori specifici pentru bacteriofagi și pentru bacteriocine (proteine produse de anumite bacterii cu acțiune letală pentru bacteriile strâns înrudite și care au un spectru îngust de acțiune în comparație cu antibioticele; aceste proteine sunt codificate de plasmide).

Periplasma sau **spațiul periplasmic** este un compartiment pericelular, care conține un număr mare de proteine, unele de natură enzimatică (RN-aze, fosfataze, penicilinaza) și altele implicate în transportul de membrană și în chemotaxie (ca proteine de legare specifică). Periplasma mai conține concentrații variabile dintr-un oligozaharid derivat din membrană (M.D.O. = „membrane derived oligosaccharide") implicat în osmoreglare. Menținerea unui volum optim al periplasmei este necesară pentru creșterea optimă a bacteriilor și moleculele M.D.O. furnizează osmomolaritatea corespunzătoare pentru a face față presiunii turgor a protoplastului.

Funcțiile peretelui celular

Peretele celular funcționează ca un sistem de rezistență mecanică ce menține întreaga structură a celulei și dă forma acesteia; asigură protecția celulei față de șocul osmotic; participă în procesul de creștere a celulei, în procesul de diviziune (prin formarea septului transversal) și de sporogeneză; are rol în procesele de schimb între celulă și mediul înconjurător. La nivelul peretelui celular sunt localizați o serie de receptori sau suprafețe de recunoaștere cu implicații multiple în activitățile și soarta celulei bacteriene. Membrana externă a peretelui celulelor Gram-negative funcționează ca o barieră de permeabilitate suplimentară (sită moleculară) între interiorul celulei și anumite substanțe din mediu: anitbiotice (penicilină), anumiți coloranți, săruri biliare și metale grele. De asemenea, membrana externă scade capacitatea de fagocitoză a celulelor organismului gazdă pentru bacteriile Gram-negative, opunându-se procesului de adeziune între fagocit și bacterie. Contribuie astfel indirect la creșterea virulenței bacteriilor patogene. Prin natura LPS membrana externă conferă celulei bacteriene o anumită „personalitate" biochimică sau calitatea de antigen. Astfel, antigenele O din structura LPS ajută la distingerea speciilor de bacterii Gram-negative (de exemplu: *Salmonella*) prin tehnici imunologice. Acest rol este comparabil cu cel al acizilor teichoici din celulele Gram-pozitive. Lipidul A sau endotoxina din alcătuirea LPS este toxic în circuitul sanguin al gazdei provocând febră și hemoliză intravasculară.

Prezenţa spaţiului periplasmic în structura peretelui unor celule bacteriene are semnificaţia unui compartiment adaptativ. Posibila prelucrare a substanţelor nutritive într-un asemenea compartiment pericelular asigură un anumit grad de eficienţă procesului de nutriţie, ceea ce explică apariţia sa în special la bacteriile din mediile naturale sărace în substanţe nutritive (de exemplu ape naturale).

Protoplastul şi sferoplastul

În mod obişnuit, membrana citoplasmatică este presată în peretele celular sub acţiunea presiunii osmotice interne care o depăşeşte pe cea a mediului extern. În medii hipertonice (de exemplu: cu 20% zaharoză sau 0,5 M KCl) are loc contracţia celulei care are ca rezultat separarea membranei celulare (altfel strâns ataşate) de peretele celular. S-a demonstrat în condiţii de laborator că în astfel de medii, digestia peretelui celular cu lizozim duce la formarea unui corp sferic foarte sensibil la variaţii de presiune osmotică. Asemenea formaţiuni sferice sunt numite **protoplaşti** (conţinutul celulei mărginit de membrana citoplasmatică) când provin din bacterii Gram-pozitive sau **sferoplaşti** (în plus cu membrană externă) când provin din bacterii Gram- negative (Fig. 12).

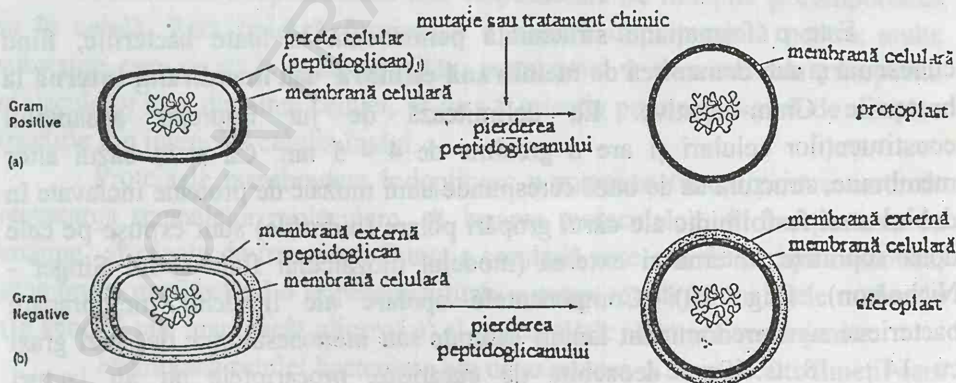


Fig. 12. Transformarea celulelor bacteriene cu perete celular în (a) protoplaşti şi (b) sferoplaşti.

Protoplaştii păstrează o serie de proprietăţi ale celulei bacteriene din care provin, au un grad de viabilitate care în condiţii speciale poate merge până la diviziune şi pot regenera peretele celular. Sunt utilizaţi pentru cercetări de chimie a microorganismelor, pentru extragerea din celulă a constituenţilor celulari, pentru realizarea transferului genetic experimental care ar fi împiedicat de perete.

Protoplaştii au căpătat o importanţă cu totul deosebită datorită tehnicilor de inginerie genetică cunoscute sub denumirea de fuziuni de protoplaşti. Tehnica se bazează pe principiul că protoplaştii bacterieni (obţinuţi prin îndepărtarea menajată a peretelui celular cu lizozim) puşi în contact, într-un mediu izoosmotic şi în prezenţa unui agent de fuziune, au tendinţa să fuzioneze, independent de specia din care provin şi să se constituie într-o celulă hibridă. Fuziunea de protoplaşti ar reprezenta astfel o metodă de transfer de material genetic care se poate realiza evitând barierele de specie şi constând într-o fuziune celulară veritabilă, cu posibilitatea unor recombinări genetice care depăşesc limitele uzuale ale mecanismelor de transfer genetic la bacterii.

Tehnica este folosită în prezent pentru obţinerea de bacterii cu proprietăţi superioare (sinteze de enzime, antibiotice, etc) utilizabile în biotehnologii.

Membrana citoplasmatică

Este o formaţiune structurală permanentă la toate bacteriile, fiind cunoscută şi sub denumirea de **membrană celulară** sau **membrană internă** la bacteriile Gram-negative. Ea delimitează de jur împrejur ansamblul constituenţilor celulari şi are o grosime de 4 - 5 nm. Ca şi în cazul altor membrane, structura sa de bază corespunde unui mozaic de proteine inclavate în dublul strat fosfolipidic ale cărui grupări polare (hidrofile) sunt expuse pe cele două suprafeţe: internă şi externă (modelul mozaicului fluid al lui Singer - Nicholson). (Fig. 10). Componentele apolare ale lipidelor membranare bacteriene sunt predominant lanţuri saturate sau mononesaturate de acizi graşi cu 14 - 18 C. Spre deosebire de eucariote, procariotele nu au lanţuri polinesaturate. Din conţinutul membranei celulei bacteriene aproximativ 30 - 40% reprezintă fosfolipidele şi 60 - 70% proteinele. Excepţii de la acestă

compoziție sunt membranele micoplasmelor care conțin o cantitate mare de steroli, cu rol de stabilizare a membranei (în lipsa peretelui celular) și membrana archaebacteriilor cu un conținut mic în acizi grași.

Structura tipică a membranei explică multe dintre particularitățile ei: flexibilitatea, solubilitatea, permeabilitatea și transportul. Membranele au un caracter dinamic constant în modificare.

Moleculele de lipide sunt mult mai puțin specifice în atracțiile lor reciproce, față de cele de proteine și acizi nucleici, astfel încât ele își pot schimba ușor contactele în interiorul aceluiași strat al structurii dublustratificate a membranei. Membranele sunt de aceea considerate **fluide bidimensionale**.

Proteinele membranare sunt de diferite tipuri (peste 100), revelate prin electroforeză în gel, după solubilizarea membranelor cu detergenți și au, corespunzător, diferite funcții. Membrana celulară bacteriană prezintă o asimetrie funcțională care este esențială pentru biologia bacteriilor. Fața internă a membranei funcționează diferit de cea externă și orientarea proteinelor transmembranare nu este întâmplătoare. Prin ruperea mecanică a celulelor bacteriene, fragmentele de membrană formează vezicule închise în care orientarea straturilor (fețelor) membranei poate fi cea normală (corectă) sau inversă. Cu ajutorul acestor vezicule pot fi studiate anumite funcții, cum ar fi transportul electronilor și secreția proteinelor.

<u>Funcțiile membranei citoplasmatice</u>

Membrana citoplasmatică este răspuzătoare de funcțiile și comportarea sa în celulă. Faza lipidică furnizează o barieră impermeabilă pentru multe substanțe, ceea ce stă la baza capacității membranei ❖ de a controla transportul moleculelor în și din afara celulei, ❖ de a fi selectiv permeabilă și ❖ de a separa reacțiile din interiorul celulei însăși.

Proteinele membranare îndeplinesc numeroase funcții printre care: ✶ receptarea semnalelor moleculare, ✶ legarea moleculelor, ✶ funcționarea ca enzime și canale de transport. Funcția esențială este cea de barieră osmotică, membrana manifestând o impermeabilitate aproape totală pentru unele molecule (în general mai mari decât glicerolul) și lăsând altele să treacă nestânjenite.

Membrana celulei bacteriene are de asemenea o serie de alte funcții care la organismele superioare sunt distribuite pe mai multe membrane. Ea este sediul sinergonului respirator și de fotosinteză, realizează concentrația activă a nutrienților și ionilor, sinteza lipidelor, secreția proteinelor (și parțial sinteza

unor proteine de tip special: exoenzime, exotoxine), transportul electronilor. Participă în procesul de formare a învelișurilor celulare (straturile externe ale anvelopei celulare și apendicelor), în fenomenele de mobilitate prin flagel și chemotaxie (prin anumiți chemoreceptori).

Mezozomii

Mezozomii (mesosomi = corpi de mijloc) se mai numesc și *plasmalemasomi* sau *corpi periferici* și sunt structuri membranare derivate din membrana plasmatică prin invaginare. Asemenea structuri pot fi de tip tubular, vezicular sau lamelar și sunt evidențiate la microscopul electronic în special la bacteriile Gram-pozitive la care sunt mai dezvoltate. Sunt structuri dinamice care aparent s-ar forma, când existența lor este necesară, ca o modalitate de extindere a membranei plasmatice.

În funcție de poziția lor în celulă și funcțiile pe care le îndeplinesc există mezozomi septali și mezozomi laterali. Mezozomii septali reprezintă invaginările membranei din dreptul peptidoglicanului sintetizat în regiunea septului de diviziune celulară și furnizează situsul de atașare la membrană pentru enzimele care intervin în replicarea ADN. Sunt asociați fizic sau topografic cu replicarea cromozomului și segregarea cromozomilor, după replicare, în celulele „fiice" în cursul diviziunii celulare; cu formarea septului de diviziune și cu procesul de sporulare.

Mezozomii laterali sunt atașați de alte regiuni ale membranei (în afara septului de diviziune) și funcționează în secreția unor enzime inductibile (ex: penicilinaza la o specie de *Bacillus*). Funcțiile mezozomilor continuă să fie controversate.

În cazul bacteriilor fotosintetizante structurile membranare interne sunt mai elaborate fiind alcătuite din lamele paralele care conțin numeroase copii ale aparatului de fotosinteză. În cursul procesului de fotosinteză, transferul de energie (în transportul de electroni) implică proteine inclavate care creează un potențial prin membrană.

Citoplasma

Din punct de vedere fizic, **citoplasma** bacteriilor este o soluție coloidală densă, un gel care menține constituenții intraparietali și reprezintă sediul principal pentru activitățile biochimice și de sinteză - care asigură viața celulei.

Componenta majoră - apa (70-80%) servește pentru un amestec complex de nutrienți: zaharuri, aminoacizi și săruri minerale, ce reprezintă rezerva celulară. Substanțele acesteia servesc ca blocuri de construcție pentru sinteze celulare sau ca surse de energie. Citoplasma conține de asemenea enzime metabolice și formațiuni celulare cum ar fi mezozomii, nucleoidul, ribozomii și granulațiile. Citoplasma bacteriilor este foarte bogată în ARN, mai ales ribozomal, ceea ce explică bazofilia celulelor normale. Pe preparate examinate la microscopul optic are aspecte diferite (omogenă sau intens granulară) după vârsta celulei. La microscopul electronic aspectul ei este fin granular datorită ribozomilor dispersați. Deoarece nu este separată de nucleoid prin membrană nucleară, citoplasma procariotelor este sediul transcrierii și traducerii genetice.

După unele date citoplasma bacteriană ar avea o structură organică tridimensională la formarea căreia proteina care predomină are rol similar actinelor. În forma polimerizată ea ar realiza o rețea contractilă în celula bacteriană, o formă rudimentară de citoschelet. Se conturează astfel posibilitatea descrierii unui anumit tip de organizare internă a citoplasmei.

Nucleoid. Cromozomul bacterian

Prin definiție bacteriile nu au nucleu propriu-zis, materialul lor genetic fiind reprezentat de o grupare de filamente de ADN circular, numit **corp cromatinic** sau **cromozom bacterian**. Molecula de ADN nu este inclusă într-o membrană nucleară, ci este agregată ca o strucutră distinctă în interiorul celulei, numită **nucleoid**.

Această regiune a citoplasmei, lipsită de ribozomi, apare la microscopul electronic mai puțin densă decât restul citoplasmei foarte bogată în ribozomi. Prin examinare la microscopul fotonic nucleoidul nu poate fi evidențiat decât prin tehnici speciale, iar existența sa demonstrată prin digestie enzimatică (alternativ cu RN-ază și DN-ază).

Nucleoidul este o structură complexă care conține ADN genomic, molecule de ARN și proteine. Nucleoidul reprezintă aptoximativ 10% din volumul celulei, deși ADN reprezintă 2-3% din greutatea uscată a celulei.

Nucleoidul este o structură în care ADN este astfel organizat încât să ocupe un volum foarte mic și este o structură care oferă destulă plasticitate pentru a permite replicarea, segregarea, repararea genomului, ca și transpoziția și transcrierea genelor.

Numeroasele studii consacrate structurii fizice și genetice a nucleoidului bacterian realizate pe *E. coli* au demonstrat existența unui cromozom unic reprezentat de o moleculă de ADN dublu catenară, circulară, covalent închisă (ADN dccc), alcătuită din 4,7 x 10^6 p.b. (g.m.= 2,5 x 10^9 ± 0,5 x 10^9 Da). Constanta de sedimentare este de 1600 - 1700 S. În 1989 a fost descris primul genom linear la *Borellia burgdorferi* (o spirochetă a artropodelor) și ulterior acest tip de moleculă a fost detectat și la alte bacterii (Gram-pozitive): *Streptomyces coelicolor, Streptomyces lividans, Rhodococcus fascians.* La *Agrobacterium tumefaciens*, o bacterie Gram-negativă, s-a relatat existența unui ADN circular și a unuia linear. Este posibil ca ADN linear să fie mai comun decât s-a crezut și ca aceste molecule să poată fi atât în formă liniară, cât și circulară.

Lungimea (L) moleculei circulare de ADN (la *E. coli*) este de aproximativ 1000 de ori mai mare decât diametrul celulei. Pentru *E. coli*, L = 1360 µm și grosimea 2,5 nm. Molecula de ADN, reprezentând unicul cromozom bacterian, este cea mai mare moleculă cunoscută până în prezent într-un sistem biologic. Această dimensiune ridică problema așezării unei asemenea molecule într-un spațiu atât de mic corespunzând zonei nucleoidului în citoplasmă, cu posibilitatea accesibilității celor ~ 4700 gene, din care este alcătuită, pentru mecanismele de replicare, transcriere și traducere a informației genetice. Molecula de ADN este împachetată într-o manieră complexă care implică un grad mare de compactare. Împachetarea ordonată a moleculei este explicată prin intervenția unor enzime care modifică topologia ADN (*topoizomeraze*) determinând plierea moleculei și fenomene de suprarăsucire (formarea de structuri suprahelicale) ca și de derulare. Mai recent, în împachetarea moleculei de ADN, s-a demonstrat implicarea și a mai multor proteine bazice din structura nucleoidului.

Pornind de la această premiză, modelul de împachetare a moleculei de ADN presupune o serie de etape, cu intervenția topoizomerazelor asupra moleculei care suferă, constrângeri topologice: pliere, suprarăsucire, suprapunere. Astfel, poate fi explicată compactarea moleculei de la 1360 µm la cca. 1µm.

Spre deosebire de concepția anterioară a unui ADN practic „nud" la bacterii și a unui ADN complexat cu proteine (histone) la eucariote (cromatină), în prezent se consideră că ADN din toate celulele este organizat sub formă de cromatină, deci este o structură compactă și dinamică de ADN - proteine - ARN. La unele Archaea, ADN cromosomal este extensiv complexat cu proteine, într-o măsură foarte asemănătoare cu cea constatată în cromozomul eucariotelor.

După datele cele mai recente corpul cromatinic sau cromozomul bacterian, respectiv molecula de ADN se află în celulă sub forma unei structuri compacte numită nucleoid. Nucleoidul este constituit din această moleculă de ADN compactă, molecule de ARN și proteine: ARN-polimerază, ADN-topoizomeraze și proteine bazice de tip histone („histone-like"). ADN este organizat în aproximativ 50 de domenii în care molecula ADN se află în tensiune sau suprarăsucită.

Fenomenul de suprarăsucire (tensiune) la care este supusă molecula enormă de ADN pentru a fi condensată în nucleoid este de două tipuri: suprarăsucire plectonemică (asemănător rotirii unei elice în spațiu, pornind de la centru) și toroidală (de tipul răsucirii ADN în nucleosomii eucariotelor) (Fig. 13).

Suprarăsucirea plectonemică este generată ca răspuns la tensiunea structurală pe care o introduc topoizomerazele în molecula circulară de ADN. ADN-topoizomerazele contribuie major la generarea superrăsucirilor de tip toroidal și la compactarea ADN. Alte proteine se asociază ADN printr-o modalitate relativ independentă de secvențele de baze; aceste proteine (de tip histone) sunt importante pentru compactarea ADN într-o manieră generală. Alte proteine sunt asociate unor secvențe specifice generând modificări topologice ale ADN la regiunea respectivă. Aceste proteine sunt importante pentru reglarea replicării și recombinarea ADN ca și în exprimarea genelor.

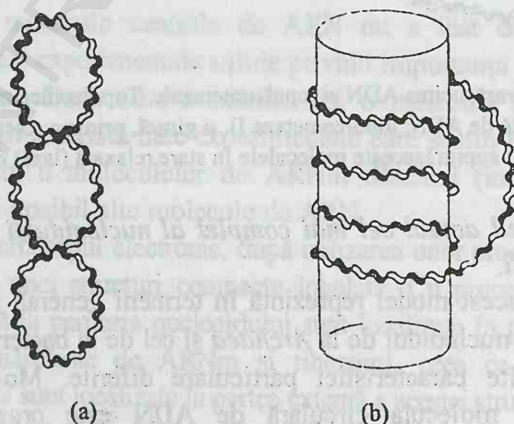


Fig. 13. Suprarăsucirea moleculei de ADN: a) plectonemică; b) toroidală.

La bacterii, gradul de suprarăsucire plectonemică a ADN este determinat în primul rând de acțiunea enzimelor numite topoizomeraze: topoizomeraza I este o endonuclează ce acționează întotdeauna pe una din cele două catene ADN, nu necesită ATP și determină relaxarea progresivă a moleculei suprarăsucite de ADN. Topoizomeraza II este o girază, o endonuclează ce necesită ATP, taie cele două catene ADN și introduce suprarăsuciri în molecula relaxată de ADN (Fig. 14). Suprarăsucirea toroidală este generată în primul rând de interacțiunea ADN - proteină și de acțiunea topoizomerazelor. Suprarăsucirea ADN joacă un rol foarte important în metabolismul ADN: replicare, reparare, recombinare, transpoziți și transcriere.

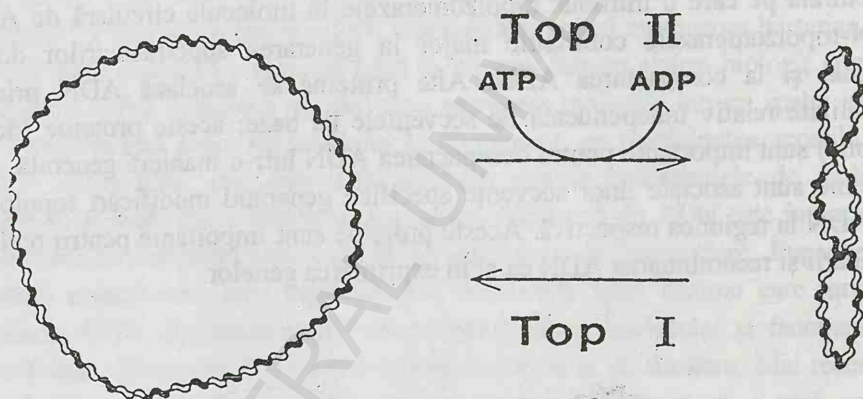


Fig. 14. Suprarăsucirea ADN și topoizomerazele. Topoizomeraza I relaxează molecula suprarăsucită de ADN; topoizomeraza II, o girază, printr-o reacție care necesită ATP, suprarăsucește moleculele în stare relaxată (laxă) de ADN.

Modelul actual cel mai complet al nucleoidului bacterian este pentru bacteria E. coli.

Dacă acest model reprezintă în termeni generali nucleoidul bacteriilor, este posibil ca nucleoidul de la *Archaea* și cel de la bacterii cu genomuri lineare să prezinte alte caracteristici particulare diferite. Modelul pentru *E. coli* presupune că molecula circulară de ADN este organizată în 43 ± 10 topodomenii (domenii topologice) (Fig. 15).

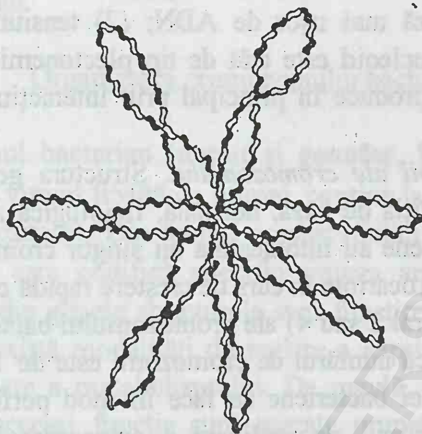


Fig. 15. Schema așăzării nucleoidului, obținută pornind de la molecula de ADN în stare relaxată (extinsă).

Numărul topodomeniilor variază în funcție de mediul de cultivare. Un topodomeniu este un segment de ADN limitat de bariere care împiedică tensiunea helicoidală a acestui segment să afecteze segmentele vecine.

Modelul originar al nucleoidului al lui Worcell și Burgi, presupune că topodomeniile sunt unite în centru de ARN și că proteinele nu sunt importante în organizarea ADN în nucleoid.

Prezența unei molecule centrale de ARN nu a fost demonstrată și actualmente există dovezi experimentale solide privind importanța proteinelor în organizarea nucleoidului. Dacă nu s-a stabilit nici o moleculă de ARN care organizează topodomeniile, există date experimentale care susțin participarea în organizarea nucleoidului a moleculelor de ARNm născând (în formare prin transcriere din ADN) și posibil alte molecule de ARN.

Examinat la microscopul electronic, după utilizarea unor procedee speciale, nucleoidul are aspectul unei structuri compacte lobulate. Cu procedeele speciale utilizate, s-a constatat că la periferia nucleoidului sunt localizate în principal ARN polimeraza, molecule născânde de ARNm și ribozomi, ceea ce sugerează că regiunile active din ADN sunt localizate în partea externă a acestei structuri.

Nucleoidul este echivalentul cromatinei din celulele eucariote. El diferă de cromatină prin două caracteristici principale: (1) proteinele bazice (tip

histonă) prezente în nucleoid nu formează structuri regulate și compacte ca histonele din nucleosomii cromatinei, ci prezintă o organizare mai puțin complexă și se disociază mai ușor de ADN; (2) tensiunea helicoidală care compactează ADN în nucleoid este atât de tip plectonemic cât și toroidal; în cromatină tensiunea se produce în principal prin interacțiunea ADN - histone (superrăsucire toroidală).

Numărul de copii ale cromozomului. Structura genetică a bacteriilor trebuie raportată la condiția de bază, normală, fiziologică a celulei. În această condiție, celulele bacteriene au întotdeauna un singur cromozom și ca urmare sunt haploide. Celulele procariote în curs de creștere rapidă conțin obișnuit copii parțial complete (în general 2 sau 4) ale cromozomului bacterian și numai când celula încetează să crească numărul de cromozomi este de 1 per celulă. Ori de câte ori diviziunea celulei bacteriene se face în mod perfect reglat, există o corelație strânsă între ritmul de replicare a cromozomului și procesul de diviziune. Când celula se găsește în condiții speciale (de ex.: medii bogate în nutrienți) apar decalaje între ritmul de replicare a cromozomului și ritmul de creștere și diviziune al celulei. Celula bacteriană încearcă să compenseze această situație prin inițierea unor cicluri suplimentare de replicare: sunt inițiate noi runde de sinteză ADN înainte ca runda veche să fie completă. Aceasta conduce la copii multiple sau copii parțiale în celulele care cresc rapid. De fapt, în celule există tot un singur cromozom, dar cu foarte multe replicații de bifurcare. Astfel în celula bacteriană se află o cantitate de informație genetică mai mare decât normală, pe seama determinanților genetici situați în apropierea originei replicării cromozomului (amplificare genică). De aceea s-a propus recurgerea la termenul de **echivalent genomic**, pentru caracterizarea structurii genetice bacteriene. Echivalentul genomic este cantitatea de acid nucleic (ADN) dintr-o bacterie, raportată la cantitatea de acid nucleic din bacteria la care ritmul de diviziune este sincron cu replicarea cromozomului (având o durată fixă de timp). Pot exista astfel într-o celulă bacteriană 1; 3; 5 echivalenți genomici.

Totuși, organismele procariote, care se reproduc asexuat, sunt tipic **haploide** din punct de vedere al complementului genetic, adică genomul minim al celulei conține o singură copie a fiecărui cromozom.

Deoarece majoritatea procariotelor par a avea un singur cromozom (la bacteria fototrofă Gram-negativă *Rhodobacter sphaeroides* s-a semnalat existența a 2 cromozomi), rezultă că informația esențială a celulei este prezentă

pe acest unic cromozom. Aceasta înseamnă o copie a fiecărei gene. Bacteriile care cresc rapid au copii multiple ale cromozomilor lor, dar acestea sunt întotdeauna duplicate.

Organizarea cromozomului bacterian

Cromozomul bacterian (numit și **genofor, lineom**) reprezentat de o moleculă de ADN, virtual lipsită de introni, conține la *E. coli*, 3000 - 4000 gene (dintre care 1500 cartate). Din totalul acestor unități genetice, 90% sunt **gene structurale**, gene care codifică specific sinteza aminoacizilor din structura enzimelor. Puține din genele structurale sunt funcționale la un moment dat. În celula bacteriană există modalități de reglare a exprimării genelor care sunt și modalități de reglare a metabolismului. De regulă, diferitele gene structurale care îndeplinesc aceeași funcție sunt așezate grupat și dispuse într-o ordine corespunzătoare ordinei în care produsele lor intră în acțiune în desfășurarea unei căi metabolice.

Informația genetică este organizată în **operoni**, unitate de structură și funcție, în care mai multe gene structurale ce participă prin produșii lor la desfășurarea unei căi metabolice sunt puse sub controlul aceleiași regiuni de reglare. În cromozomul bacterian există **gene de reglare** care participă la formarea substanțelor de tipul *represorilor*. Funcționarea lor determină stoparea activității **genelor din operator**. Regiunea operator este o regiune din cromozom care funcționează ca receptor de semnale, controlează transcrierea genelor structurale fiind pentru acestea un fel de comutator.

Adiacentă regiunii operator, este **regiunea promotor** care corespunde locului în care are loc inițierea transcrierii informației genetice (legarea ARN-polimerazei).

În structura cromozomului bacterian există și o **regiune care leagă cromozomul de mezozom** și gene care corespund **originii replicării** și **stopării** acesteia. De asemenea, pot exista ***determinanți genetici neesențiali*** (accesorii) care reprezintă însă constituenți normali ai cromozomului bacterian. Ei sunt reprezentati de **secvențele de inserție (I.S.)** și **transpozonii (Tn)**, elemente genetice mobile, capabile de transpoziție (mobilizare și deplasare într-o altă poziție în structura cromozomului respectiv sau în alte structuri genetice intracelulare). I.S. (ex: IS_1 de la *E. coli*) sunt secvențe ale moleculei de

ADN (800 - 1400 p.b.) care nu conțin nici o genă structurală capabilă să confere celulei purtătoare un caracter fenotipic nou. Tn (ex: Tn $_{1681}$ de la *E. coli*) sunt secvențe spacifice de ADN ce includ o serie de gene structurale, delimitate la extremități de I.S.. Existența elementelor genetice mobile asigură una din căile complexe ale potențialului de variabilitate și evoluție a bacteriilor.

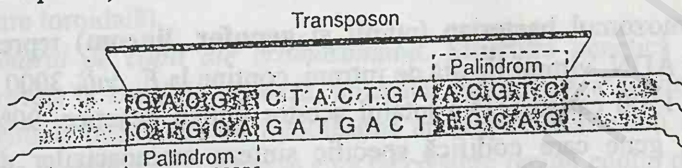


Fig. 16. Un transpozon circumscris de secvențe palindromice.

Schimbul genetic la procariote. În ciuda naturii lor haploide și a faptului că reproducerea este asexuată, în celulele procariote există procese de schimb genetic extensiv dar mecanismele sunt total distincte de procesul de la eucariote. În primul rând, procesul este fragmentar, aproape niciodată nu implică în întregime complementul de cromozomi ai celor două celule. În al doilea rând, ADN este transferat unidirecțional, de la un donor la un receptor. În al treilea rând, mecanismele prin care apare transferul de ADN sunt specializate. Pentru transferul ADN au fost recunoscute trei tipuri distincte de mecanisme: (1) **conjugare**, în care transferul de ADN apare ca rezultat al contactului celulă - celulă (proces care se apropie cel mai mult de cel de sexualitate de la eucariote); (2) **transducție**, în care transferul de ADN este mediat de virusuri și (3) **transformare**, în care este implicat ADN liber. În transformare, celula donoare în general se lizează, ADN care este eliberat din aceasta este preluat din celulele receptor. Toate cele trei mecanisme de transfer de gene s-au dovedit a apare la anumite Archaea ca și la Bacteria. Procesele sunt urmate de integrarea ADN în receptor prin mecanisme de recombinare genetică.

Funcțiile nucleoidului

Cromozomul bacterian conține informația genetică esențială, necesară pentru existența celulelor bacteriene în mediul lor natural; pentru formarea structurilor și arhitecturii celulare; pentru activitățile metabolice și reglarea acestora; pentru replicare, ereditate, variabilitate și evoluție. Potențialul de

variabilitate și evoluție este asigurat prin căi complexe: capacitatea de mutageneză (modificări în secvența bazelor ADN), capacitatea de reparare predispusă la erori, capacitatea de a integra gene plasmidiale și existența elementelor genetice mobile de tipul Tn. Deși structura genetică a bacteriilor nu este imuabilă, genele din cromozom sunt coadaptate.

Plasmidele

Plasmidele sunt structuri moleculare invizibile prin tehnici uzuale *in situ*, dar evidente la microscopul electronic după extracție și purificare. Reprezintă o **informație genetică accesorie, extracromozomială,** ce favorizează existența celulelor bacteriene în medii neobișnuite. Prezența plasmidelor pare să fie un fenomen universal în lumea bacteriilor, deși existența lor este limitată la un număr limitat de specii. Peste 300 din numărul total de plasmide cunoscute au fost descrise la *E. coli*. Denumirea lor utilizează un indicativ după prescurtarea p. (de ex.: pBR322). Din punct de vedere structural, plasmidele sunt molecule mici de ADNdccc numite și **minicromozomi** datorită dimensiunilor (1-2% din mărimea cromozomului bacterian). Principalele categorii de determinanți genetici din structura plasmidelor sunt aceleași ca și în cromozomul bacterian, însă moleculele de ADN din structura plasmidelor au un procent molar de baze G+C diferit de cel al cromozomului ceea ce denotă un conținut de informație genetică diferită de cel al cromozomului bacterian. Ca și în cazul cromozomului, circularitatea moleculei este o necesitate pentru reglarea replicării și supunerea unor constrângeri topologice care determină structuri hiperrăsucite.

După cum la un număr mic de bacterii (vezi nucleoid) a fost semnalată existența unor cromozomi lineari și în cazul plasmidelor au fost evidențiate unele bacterii (*Borrelia burgdorferi*; halobacterii) cu plasmide circulare și lineare. Marea majoritate a plasmidelor sunt însă molecule de ADN circulare.

Structura fizică a plasmidelor corespunde unor molecule monomere sau oligomere (concatemere sau concatenate). Plasmidele sunt entități genetice cu caracter de replicon însă replicarea lor este controlată de cromozom. Exercitarea acestui control, de care depinde numărul plasmidelor într-o celulă bacteriană poate fi: absolută, în cazul plasmidelor integrate în cromozomul bacterian;

stringentă, evidentă în cazul plasmidelor mari; relaxată, situaţie în care numărul plasmidelor într-o celulă bacteriană poate fi de zeci sau chiar sute.

Există posibilitatea eliminării plasmidelor din celulă (*vindecare* de plasmide). Acest fenomen are o apariţie spontană (cu o frecvenţă relativ mică) sau poate fi indus sub acţiunea unor substanţe chimice (bromura de etidiu, SDS, acriflavină, detergenţi şi altele). Inducerea fenomenului, care se realizează mult mai rapid, are o mare importanţă practică în cazul anumitor plasmide existente în celulele bacteriilor patogene.

Clasificarea plasmidelor se poate face după mai multe criterii: (1) bazat pe capacitatea de a induce conjugare (transfer de material genetic de la o bacterie donatoare la una receptoare); (2) bazat pe capacitatea unor plasmide de a se integra în cromozomul celulei gazdă; (3) criteriul compatibilităţii, ţinând cont că plasmide de acelaşi tip sunt incompatibile în aceeaşi celulă şi (4) criterii bazate pe proprietăţile majore (funcţionale), distinctive ale plasmidelor studiate, deşi multe plasmide sunt polifuncţionale.

După criteriul 1 plasmidele pot fi caracterizate ca: plasmide conjugative, care conţin opronul *tra* şi sunt numite şi transmisibile, infecţioase, de fertilitate, conjugoni (transferoni) şi plasmide neconjugative, la care poate fi transmis (indus) caracterul de conjugon.

După criteriul 2 sunt: plasmide integrative, care pot exista în două stări alternative, integrate reversibil în cromozomul bacterian (au fost denumite şi episomi = <corpi adăugaţi>) şi în stare autonomă; plasmide neintegrative, care există în stare autonomă şi nu se pot integra în cromozom.

După criteriul 3 au fost descrise un număr de grupe de compatibilitate.

Din punct de vedere al proprietăţilor majore, dictate de existenţa unor determinanţi genetici specifici, au fost descrise şi caracterizate o serie de plasmide dintre care pentru importanţa lor sunt de reţinut:

- plasmidele F (din engl. *Fertility*), conţin operonul *tra* (alcătuit din 14-15 gene) care reglează capacitatea de transfer de material genetic prin conjugare. Ele conferă celulei bacteriene capacităţi echivalente cu *caracterul de mascul* şi sunt răspunzătoare de sinteza *pilului de sex*. Sunt cunoscute şi sub denumirea de **factor de sex**. Pot exista în celula bacteriană în mai multe forme diferite care influenţează evoluţia procesului de conjugare: în stare autonomă (bacteria gazdă are caracter mascul), în stare integrată în cromozomul celulei care devine *supermascul* (Hfr) cu capacitate sporită de conjugare şi transfer de

gene cromozomale și în stare autonomă prin excizie eronată din cromozomul celulei Hfr când bacteria donator (F'), care conține plasmida + gene cromozomale, transmite prin conjugare în special gene plasmidiale. (Fig. 17).

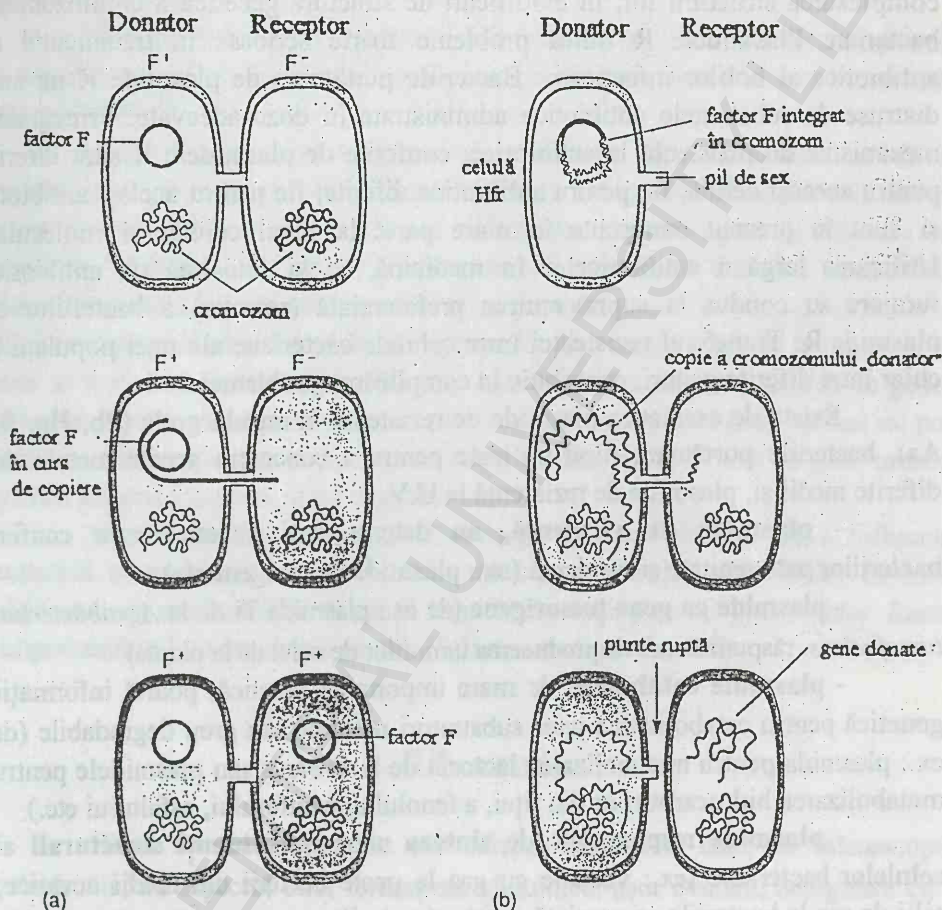


Fig. 17. Evoluția procesului de conjugare în funcție de starea plasmidei F. (a) Transfer de factor F sau plasmidă conjugativă, existentă în stare normală. (b) Transfer de gene cromozomale din celula Hfr („high frequency of recombination") cu plasmida F integrată în cromozom.

- **plasmidele R**, conțin gene care determină rezistența celulei gazdă la antibiotice, sulfamide, substanțe chimioterapice. Aceste plasmide de rezistență infecțioasă sau de rezistență multiplă au caracter de conjugon și capacitate de a forma (prin recombinare) agregate plasmidiale sau plasmide "gigant" de

rezistență multiplă. În structura plasmidelor R, genele pentru rezistența la antibiotice pot fi incluse în Tn (elemente genetice mobile). Mutarea pe un replicon diferit a avut și are rol și în prezent în formarea plasmidelor R, în complexarea structurii lor, în modificări de structură genetică a cromozomului bacterian. Plasmidele R ridică probleme foarte serioase în tratamentul cu antibiotice al bolilor infecțioase. Bacteriile purtătoare de plasmide R nu sunt distruse de substanțele antibiotice administrate în doze adecvate. Principalele mecanisme de rezistență la antibiotice, conferite de plasmidele R sunt diferite pentru aceeași celulă, fie pentru antibiotice diferite, fie pentru același antibiotic și sunt în prezent cunoscute în mare parte la nivel celular și molecular. Utilizarea largă a antibioticelor în medicină, ca și folosirea de antibiotice furajere au condus la supraviețuirea preferențială (selecția) a bacteriilor cu plasmide R. Transferul rezistenței între celulele bacteriene ale unei populații și chiar între diferite genuri, contribuie la complicarea problemei.

Există de asemenea plasmide de rezistență la metale grele (Pb, Hg, Bi, As), bacteriile purtătoare fiind utilizate pentru a concentra aceste metale din diferite medii și, plasmide de rezistență la U.V.

- **plasmide de virulență**, au determinanți genetici care conferă bacteriilor patogenitate și virulență (ex.: plasmide de toxigenitate)

- **plasmide cu gene tumorigene** (de ex.: plasmida Ti de la *Agrobacterium tumefaciens*, răspunzătoare de producerea tumorilor de colet de la plante)

- **plasmide catabolice**, de mare importanță practică, poartă informație genetică pentru catabolizarea unor substraturi naturale sau greu degradabile (de ex.: plasmida pentru metabolizarea lactozei de la *Proteus* sau plasmidele pentru metabolizarea hidrocarburilor din țiței, a fenolului, camforului, asfaltului etc.)

- **plasmide** responsabile de **sinteza** unor **constituenți structurali** ai celulelor bacteriene (ex.: vacuole cu gaz la unele bacterii din medii acvatice; pilii de sex la bacteriile ce prezintă aceste structuri)

- **plasmide** cu informație genetică necesară **sintezei** unor **substanțe antibiotice** (cloramfenicol) sau de tip special (colicine).

Semnificația biologică a plasmidelor este legată de posibilitatea transferului plasmidelor pe diferite căi de la o celulă bacteriană la alta, aparținând nu numai aceleiași specii ci și unor specii și chiar genuri diferite. Există astfel posibilitatea unui schimb masiv de informație genetică în cazul populațiilor bacteriene care trăiesc într-un spațiu limitat, a unui flux genetic

asociat unor proprietăți care pot apare în celula bacteriană sau pot fi pierdute. Există de asemenea date experimentale ce demonstrează importanța evolutivă a schimbului de gene între cromozom și plasmide, schimb a cărui semnificație nu trebuie exagerată.

Plasmidele conferă proprietăți noi bacteriilor, ce le permit adaptarea la condiții aparte și reprezintă o sursă de variabilitate pentru celula bacteriană (ex.: plasmida R).

Importanța practică a plasmidelor decurge din capacitatea lor de a îngloba gene noi (care conferă proprietăți noi) inclusiv de la celula animală și vegetală. Plasmidele s-au dovedit a fi un bun vector pentru gene în tehnicile de inginerie genetică cu scopul reprogramării genetice. Datorită capacității plasmidelor de a incorpora gene străine se pot realiza atât *in vivo* cât și *in vitro* două categorii de plasmide: hibride (plasmide care conțin gene de la organisme, cum ar fi *E. coli, Salmonella, Shigella*, care în mod normal au schimb de gene) și himere (care conțin gene provenite de la organisme care în mod normal nu pot schimba informație genetică, cum ar fi o plasmidă de la *E. coli* cu gene umane pentru sinteza insulinei, interferonului etc.).

O altă importanță practică decurge din posibilitatea de a influența numărul plasmidelor în celulă. Prin mărirea numărului plasmidelor în mod deliberat se realizează în condiții controlate *amplificarea plasmidelor* foarte importantă în biotehnologie pentru obținerea unui produs util.

Ribozomii

Sunt structuri esențiale ale celulei bacteriene care, la microscopul electronic, au aspectul unor formațiuni sferoidale, ușor ovalare, neregulate cu ϕ 20 nm. Pot fi dispersați în citoplasmă conferindu-i un aspect fin granular (Fig. 40) sau atașați de membrana citoplasmatică și mezozomi. Din punct de vedere chimic sunt alcătuiți din ARNr (aproximativ 60%) și proteine (40%).

Caracterizarea ribozomilor prin constanta de sedimentare S (Svedberg) și observații la microscopul electronic au relevat faptul că ribozomii caracteristici procariotelor: 70S sunt alcătuiți din două subunități: **subunitatea mică 30S** și **subunitatea mare 50S** care pot fi disociate sau într-o formă asociată, funcțională. Când concentrația ionilor de magneziu crește, are loc

asocierea subunităților, iar când scade, disocierea lor.Ribozomii 70S conțin în ansamblu 55 molecule de proteine și 3 molecule de ARNr, repartizate pe subunități. Subunitatea mică (30S) conține 21 de molecule de proteine notate ce S (din engl. <small> = mic) urmat de o cifră și 1 moleculă ARNr - 16S. Subunitatea mare (50S) are 34 molecule de proteine notate cu L (din engl. <large> = mare) urmat de o cifră și 2 molecule de ARNr: 23 S și 5S.

Prin tehnici fizice și biochimice speciale s-a stabilit mecanismul de formare și funcționare a acestor structuri cu o arhitectură bine stabilită în care ARN are un rol esențial în așezarea spațială a moleculelor de proteină. Moleculele de proteină ocupă în subunitatea respectivă poziții fixe, bine definite ce explică asamblarea rapidă a ribozomilor la nevoie. Ribozomii reprezintă structuri model pentru studiul interacțiunilor proteină - proteină și proteină - ARN. Forma reală a subunităților este redată schematic în Fig. 18; acestea se aranjează împreună formând un fel de platformă în miniatură pentru realizarea sintezei proteinelor.

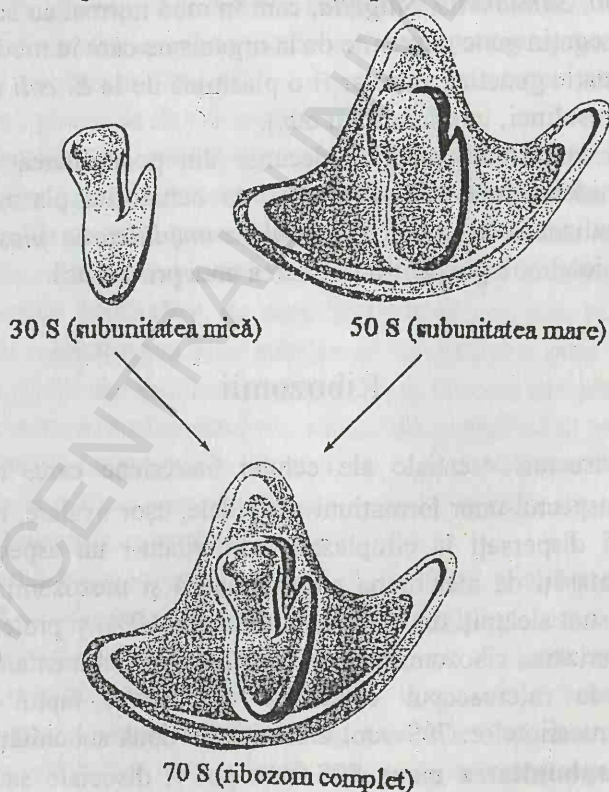


Fig. 18. Modelul ribozomului de la procariote, cu cele două subunități: separate și asociate.

Capacitatea de sinteză și asamblare a ribozomilor în celulă este imensă. În celula aflată într-o stare de echilibru, numărul lor global este de ~ 15000, iar în celule cu metabolisma activ > 100000. Subunitățile acestor structuri dinamice sunt supuse unui *turn-over* astfel încât capacitatea imensă de sinteză compensează disocierea.

<u>Funcția esențială</u> a ribozomilor este cea de "fabrici de proteine", la nivelul lor realizându-se traducerea informației genetice adusă de ARNm. Ei reprezintă sediul sintezei enzimelor intra- și extracelulare. În celulele care metabolizează intens, ribozomii se pot atașa în lanțuri (poliribozomi sau polizomi) la nivelul cărora molecula de ARNm este tradusă simultan de un număr de ribozomi. Prin molecula de ARNr 16S ribozomii au semnificație de semantidă, utilizată în studiile de filogenie moleculară.

Incluziunile și granulațiile

Sunt structuri inerte care apar în celula bacteriană în condiții speciale de mediu, de regulă în condiții de abundență a surselor nutritive și în prezența unui dezechilibru între carbon și azot. Prezența și abundența lor este astfel condiționată de factorii de mediu. Mărimea, forma, conținutul și numărul incluziilor sunt diferite. Obișnuit denumirea de incluzie este dată oricărei substanțe menținute în citoplasmă într-o stare insolubilă.

Unele incluzii sunt comune unei largi varietăți de bacterii, în timp ce altele sunt caracteristice unui număr limitat de specii și de aceea servesc în identificare. Majoritatea incluziilor conțin compuși organici bogați în energie, incluși în membrane de tip special. Granulațiile conțin obișnuit compuși anorganici neincluși în membrane.

Cele mai frecvente și caracteristice celulelor bacteriene sunt: incluziile de glicogen și amidon; de poli-β hidroxibutirat (material de rezervă tipic pentru celula procariotă); incluzii parasporale cu conținut polipeptidic (utilizate în practică pentru combaterea unor insecte dăunătoare); carboxizomii care conțin enzima ribulozo-1,5-difosfat carboxilaza necesară procesului de fotosinteză; granulații de sulf prezente la bacteriile sulfuroase; granulațiile de polifosfat (volutină) care sunt metacromatice și au semnificație de diagnostic pentru *Corynebacterium diphteriae*.

O categorie aparte de incluzii, numită magnetozomi, conțin magnetită (Fe_3O_4) și sunt răspunzătoare de fenomenele de orientare și migrare descrise la unele bacterii sub influența câmpurilor magnetice slabe sau a câmpului magnetic al pământului (magnetotaxie). Bacteriile magnetotactice au fost izolate din sedimentele marine și de apă dulce, singura obținută și caracterizată în cultură pură fiind *Aquaspirillum magnetotacticum*. (Fig. 19). Studiul sintezei și funcției magnetozomilor reprezintă un model pentru explicarea formării oxizilor de fier similari de la păsări, insecte și alte animale care manifestă magnetotaxie. Cercetarea ecologiei bacteriilor magnetotactice furnizează oamenilor de știință un instrument pentru studiul câmpului magnetic al pământului. Examinarea orientării fosilelor de bacterii magnetotactice conservate în roci sau sedimente poate fi concludentă pentru deplasarea continentelor în relație cu polii magnetici. Orientarea bacteriilor magnetotactice față de fosilele mutante (ca urmare a cantității de radiații sporite în cursul reversiilor magnetice) poate aduce argumente privind măsura în care reversiile magnetice afectează evoluția.



Fig. 19. Aquaspirillum magnetotacticum prezentând un lanț de magnetosomi. Este vizibilă de asemenea membrana externă a peretelui bacteriei Gram-negative.

Un tip unic de incluzie, după unii autori, îl reprezintă veziculele cu gaz care furnizează posibilitatea de flotație a unor bacterii acvatice.

Semnificația generală a majorității incluziilor este cea de depozite de substanțe utile pentru celule, din care celula poate mobiliza treptat sursa înmagazinată ca necesară. Majoritatea bacteriilor sunt supuse, în mediul natural, unor modificări severe privind disponibilitatea hranei astfel încât cinetica de formare și de degradare a incluziilor le permite unele compensații. Incluziile pot avea de asemenea, rol protector față de dezechilibrul de ordin osmotic și în anumite cazuri apără celula bacteriană de acidifierea mediului intern.

Endosporul

Numeroase dovezi demonstrează că anatomia bacteriilor permite adaptarea lor la habitate adverse. Dintre toate structurile microorganismelor, nici una nu se poate compara cu endosporul bacterian din punct de vedere al rezistenței la condiții ostile și facilitarea supraviețuirii.

Există cel puțin zece tipuri diferite de spori la bacterii, caracterizând diferite grupuri sistematice și care au particularități diferite după structura, modul de formare, particularitățile biologice. Endosporii sunt frecvenți la bacteriile Gram-pozitive cilindrice, din genurile: *Bacillus, Clostridium* și altele câteva, fiind excepționali la cele în formă de coc: *Sporosarcina.* Unele dintre acestea sunt bacterii patogene.

Endosporul sau sporul endogen este o structură intracelulară diferită de celula vegetativă în interiorul căreia se formează ca o formă primitivă de diferențiere. *Este rezultatul unor modificări ultrastructurale, chimice, enzimatice și biologice, consecutive fenomenului de* **sporulare sau sporogeneză**.

Sporularea întrerupe ciclul de viață obișnuit al bacteriilor sporogene (dintre care multe au ca habitat solul) în două faze numite: **vegetativă** și de **sporulare** (Fig.20).

În timp ce celula vegetativă este o entitate metabolic activă, în curs de creștere, sporul este o entitate inertă, latentă (**formă de criptobioză**).

Datorită refringenței sale deosebite sporul este ușor de evidențiat la microscopul optic pe preparate proaspete, iar pe frotiuri numai cu tehnici speciale care permit penetrarea și colorarea învelișurilor sporale groase și conținutului său particular.

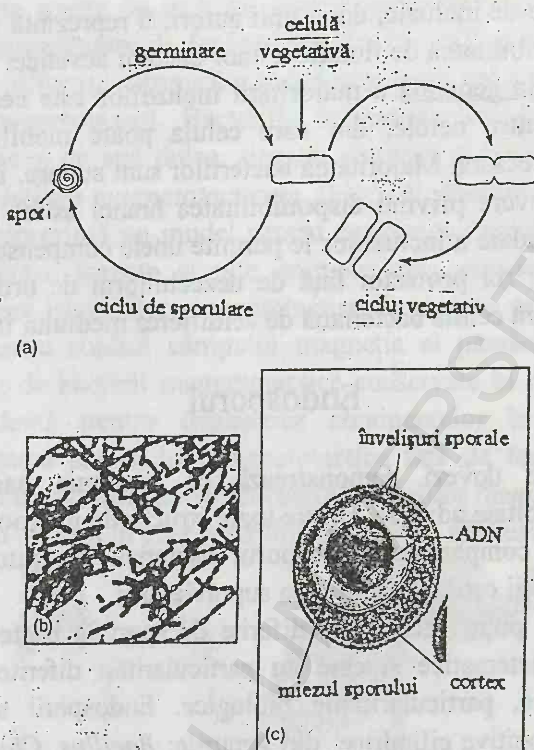


Fig. 20. (a) Ciclul de viață al unei bacterii formatoare de *spor*. (b) Aspect al unui frotiu de *Clostridium* colorat Gram, cu porțiuni centrale incolore care marchează poziția sporilor. (c) Secțiunea transversală a unui spor, cu evidențierea a numeroase straturi.

Dimensiunile, forma și poziția endosporilor în celula vegetativă sunt într-o anumită măsură utile în identificarea anumitor specii.

Particularitățile structurale și cele chimice explică neobișnuita rezistență la temperaturi ridicate, la acțiunea antisepticelor, dezinfectantelor, radiațiilor.

Din punct de vedere structural, endosporul conține un **miez** în care se află materialul genetic (ADN) în **sporoplasmă** (Fig. 21). Acesta este înconjurat de un **cortex** format din *peptidoglican* modificat în cursul procesului de sporogeneză și *învelișuri sporale proteice* alcătuite dintr-o proteină de tip cheratină (*keratin - like*) bogată în grupări S-S. La unii spori învelișul sporal este înconjurat de **exospor**, o membrană protein-lipidică. Din punct de vedere a particularităților chimice, endosporul se caracterizează prin absența unor enzime

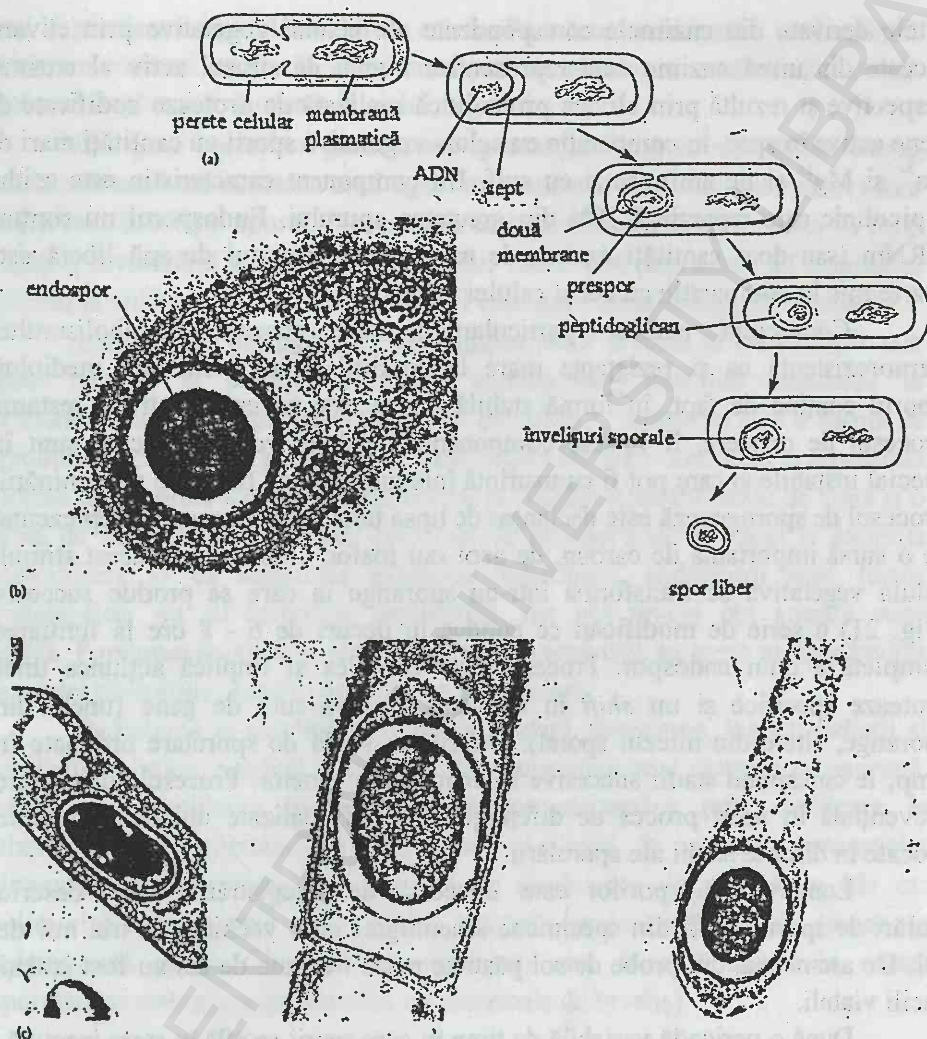


Fig. 21. Endospori. (a) Sporogeneza, procesul de formare a endosporului. (b) Microelectronografia unui endospor de *Bacillus sphaericus*. (c) Diferite localizări ale endosporilor. Stânga: endospor central la *Bacillus megaterium* (x 40.500); centru: endospor subterminal la *B. anthracis* (x 38.000); dreapta: endospor terminal, deformant, la *C. tetani* (x 14.000).

cu importanţă fundamentală (ca cele ale ciclului Krebs) şi absenţa sistemelor transportoare de electroni. În endospori sunt prezente însă puţine enzime, dintre care unele sunt enzime noi, stabile, specifice, incluse în cursul sporulării, iar

altele derivate din enzimele corespondente ale celulai vegetative prin clivare. Aceste din urmă enzime sunt reprezentate numai de situsul activ al enzimei respective și rezultă prin clivare proteolitică realizată de proteaze codificate de gene active în spor. În comparație cu celula vegetativă sporii au cantități mari de Ca^{2+} și Mg^{2+} și de aminoacizi cu sulf. Un component caracteristic este acidul dipicolinic care reprezintă 10% din greutatea sporului. Endosporul nu conține ARNm (sau doar cantități extrem de mici), iar conținutul de apă liberă este foarte mic în comparație cu cel al celulei vegetative.

Consecința acestor particularități este absența metabolismului, termorezistența ca și rezistența mare la condiții nefavorabile ale mediului. Sporul conține de fapt, în formă stabilă tot ce este necesar pentru a restaura procesul de creștere; îi lipsesc componentele celulei vegetative care sunt în special instabile și care pot fi cu ușurință înlocuite în faza timpurie a germinării. Procesul de sporogeneză este declanșat de lipsa unui nutrient esențial reprezentat de o sursă importantă de carbon, de azot sau fosfor. Odată primit acest stimul, celula vegetativă se transformă într-un sporange în care se produc succesiv (Fig. 21) o serie de modificări ce conduc în decurs de 6 - 8 ore la formarea completă a unui endospor. Procesul este complex și implică acțiunea unor proteaze specifice și un *shift* în activarea câtorva sute de gene (unele din sporange, altele din miezul sporal). Diferitelor stadii de sporulare ordonate în timp, le corespund stadii succesive în exprimarea genelor. Procesele de reglare secvențială în acest proces de diferențiere pot fi analizate utilizând mutante blocate în diferite stadii ale sporulării.

Longevitatea sporilor este dovedită de înregistrările care descriu izolări de spori viabili din specimene arheologice cu o vechime de trei mii de ani. De asemenea, din probe de sol păstrate peste trei sute de ani au fost izolați bacili viabili.

După o perioadă variabilă de timp în care sporii se află în stare inactivă, poate avea loc în condiții favorabile **procesul de germinare.** Întreruperea latenței (germinarea) are loc în prezența apei și a unui agent de germinare reprezentat de un factor chimic sau de mediu, în general un aminoacid sau o sare anorganică. Odată inițiată, germinarea evoluează rapid (90 minute) într-o serie de etape până la refacerea celulei vegetative. Agentul de germinare stimulează formarea enzimelor hidrolitice de către membranele sporului. Sub acțiunea acestor enzime cortexul este digerat, ceea ce permite pătrunderea apei în miezul

sporal și pierderea dipicolinatului de calciu. Pe măsura rehidratării și absorbției nutrienților, miezul crește în afara învelișurilor sporale, reconstituind o celulă vegetativă deplin activă care reia ciclul vegetativ.

Unii spori bacterieni germinează spontan, în timp ce alții rămân latenți până la activarea sub acțiunea unui agent traumatizant (mecanic sau chimic) care deteriorează învelișul sporal. Necesitatea activării limitează germinarea în timp și spațiu, favorizând supraviețuirea tulpinii bacteriene prin aceea că împiedică germinarea unifomă ca răspuns la condiții care sunt numai temporar favorabile.

Semnificația biologică a endosporului poate fi luată în considerație sub aspect teoretic și practic. Formarea endosporului neavând implicații în diviziunea celulară și sporirea numărului de celule, , acesta nu este o formă de reproducere, ci o formă primitivă de diferențiere celulară. Endosporul reprezintă o formă de adaptare a celulelor bacteriene la condițiile nefavorabile de viață și o formă de conservare a speciei. Întocmai ca exosporii de la fungi și anumite actinomicete și ca semințele plantelor superioare, endosporii sunt forme criptobiotice: nu au activitate metabolică, dar pot reveni din această stare latentă. Formarea sporilor și restaurarea stării vegetative au trezit un larg interes ca model unicelular, simplu de diferențiere celulară.

Rezistența la condiții extreme de căldură, uscăciune, îngheț, radiații și substanțe chimice, condiții în care celulele vegetative sunt distruse cu ușurință, ridică mari probleme în controlul microorganismelor prin sterilizare în laboratoarele de microbiologie, în spitale și clinici, în industria conservelor alimentare. Sporogeneza este asociată cu producerea de antibiotice (de ex: polimixină), de enzime utile pentru practică (proteinaze) sau de toxine (o enterotoxină de la *Clostridium perfringens* este formată numia în cursul sporulării și este serologic înrudită cu proteinele de înveliș).

Glicocalix, capsulă, strat mucos

Pe suprafața externă a diferitelor bacterii există o varietate largă de materiale și structuri, care nu sunt esențiale pentru existența acestora, dar care influențează puternic interacțiunea cu mediul. Aceste structuri pot fi exploatate din punct de vedere teoretic și practic.

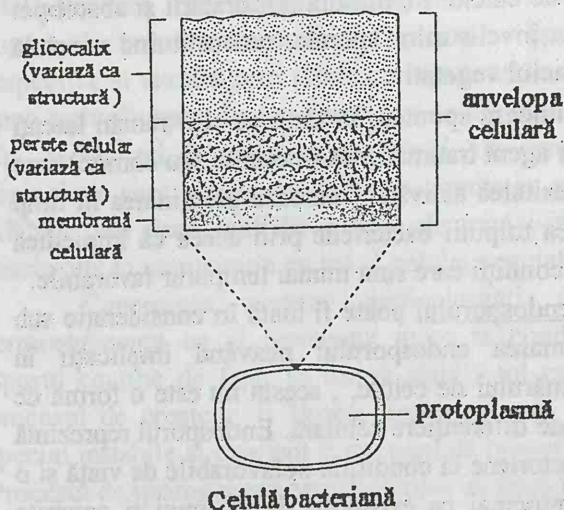


Fig. 22. Straturile anvelopei celulare.

Studii detaliate au relevat că peretele celular nu este învelișul cel mai extern, majoritattea celulelor având învelișuri superficiale de diferite tipuri astfel încât suprafața bacteriilor prezintă o anatomie foarte diversă. De aceea se poate utiliza termenul de **anvelopă celulară** pentru complexul de straturi externe protoplasmei celulare. În acestă accepțiune, cele trei straturi externe de bază, care pot fi identificate la microscopul electronic, sunt membrana citoplasmatică, peretele celular și glicocalixul. (Fig. 22). Aceste structuri acționează împreună ca o singură unitate de protecție, deși fiecare dintre ele realizează o funcție distinctă. Anvelopa poate reprezenta 1/10 până la 1/2 din volumul celulei.

Glicocalixul este o structură extraparietală care se dezvoltă la suprafața celulei bacteriene sub forma unui înveliș alcătuit din substanțe polimere. Reprezintă o structură inertă, accesorie, care nu este absolut esențială pentru supraviețuirea bacteriilor. O denumire alternativă, prescurtată este **E.P.S.** (de la *extracellular polymeric substance*). Glicocalixul bacteriilor este diferit din punct de vedere a grosimii, structurii, compoziției și complexității chimice. Unele bacterii prezintă un înveliș lax, solubil, numit **strat mucos**. Alte bacterii formează o **capsulă** alcătuită din unități polizaharidice repetitive, din polipeptide sau din ambele categorii de substanțe. (Fig. 23). Spre deosebire de stratul mucos, capsula are o margine bine definită, este legată într-o anumită măsură de celulă și are o comsistență gumoasă, care dă un pronunțat caracter mucoid coloniilor (Fig. 24 a) și culturilor bacteriene respective. Capsula poate fi evidențiată la microscopul optic pe preparate proaspete (Fig. 24 b) prin colorații negative (de exemplu: suspensii în tuș de India) ca o zonă clară între fondul opac al preparatului și corpul celular refringent (sau colorat). Examinarea la microscopul electronic nu relevă detalii semnificative.

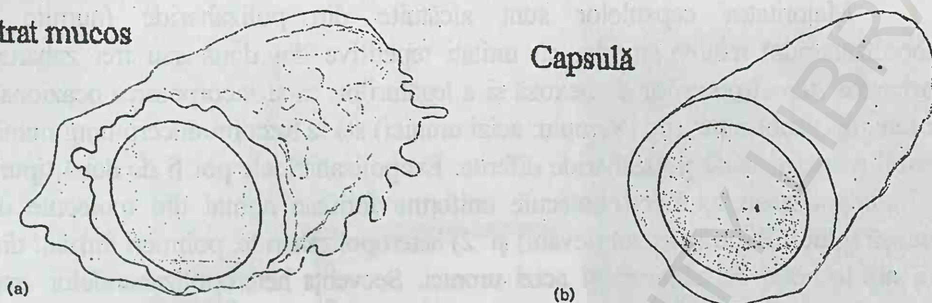


Fig. 23. Tipuri de glicocalix reprezentate pe celule bacteriene secționate. (a) Strat mucos; (b) Capsulă.

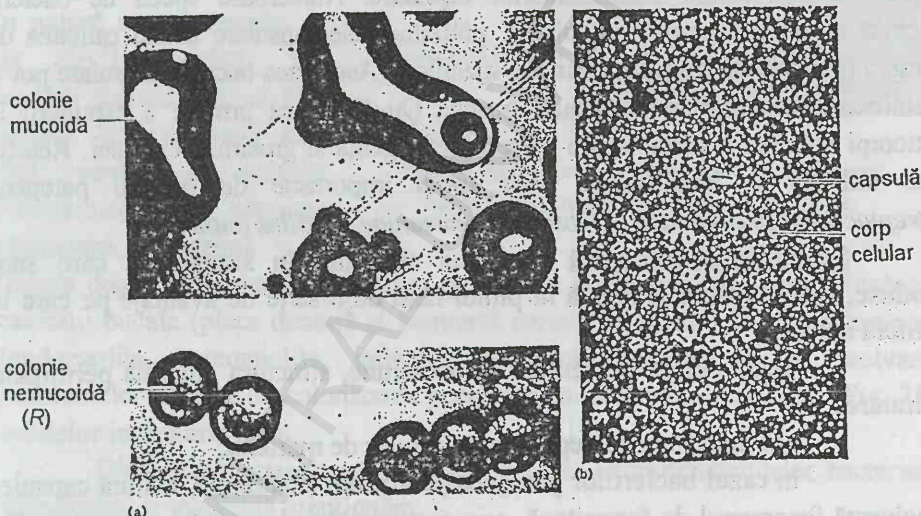


Fig. 24. (a) Aspectul macroscopic al coloniilor formate de celule capsulate (mucoid) în comparație cu al celor formate din celule lipsite de capsulă (nemucoid). (b) Aspectul microscopic al capsulei evidențiate pe preparate colorate negativ.

Grosimea capsulei variază în funcție de condițiile nutritive, de temperatură și de apariția mutațiilor. Producerea capsulei este o proprietate controlată genetic, care poate fi pierdută prin mutație și redobândită prin mutație inversă. La majoritatea bacteriilor patogene, producerea capsulei este o proprietate stabilă și pierderea ei în culturi obișnuite de laborator este corelată cu eliminarea patogenității.

Majoritatea capsulelor sunt alcătuite din polizaharide (numite și exopolizaharide) relativ simple, cu unități repetitive din două sau trei zaharuri. Varietatea stereoizomerilor de hexoză și a legăturilor, ca și incorporarea ocazională de zaharuri neobișnuite (de exemplu: acizi uronici) stă la baza producerii unui număr posibil foarte mare de polizaharide diferite. Exopolizaharidele pot fi de două tipuri: 1) homopolizaharide, macromolecule uniforme formate numai din molecule de glucoză (glucani) sau fructoză (levani) și 2) heteropolizaharide, polimeri formați din mai multe tipuri de zaharuri și acizi uronici. Secvența heteropolizaharidelor este determinată genetic, fiind specifică pentru bacteriile respective. Datorită acestei specificități de structură, bacteriile în cauză pot fi identificate cu ușurință și pot fi clasificate în unități taxonomice infraspecifice și infrasubspecifice (serovar) care se deosebesc prin natura polizaharidelor capsulare. Numeroase specii de bacterii prezintă capsule distincte imunologic, polizaharidele capsulare având calitatea de antigen (pot stimula răspunsuri imune specifice). Asemenea bacterii capsulate pot fi identificate prin umflarea capsulei (reacția *Quellung*) ca urmare a expunerii la anticorpi specifici a căror legare mărește refringența și grosimea capsulei. Reacția este utilizată în identificarea unor specii importante de bacterii patogene (*Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Bacillus anthracis*).

Semnificația biologică a acestor structuri, în situația în care sunt produse, este multiplă și legată în pimul rând de o serie de avantaje pe care le conferă celulei:

- apără celula bacteriană de uscăciune, structura chimică permițând hidratarea;
- pot funcționa ca depozit extracelular de nutrienți;
- în cazul bacteriilor patogene pentru om și animale, textura capsulei blochează fenomenul de fagocitoză, prin aceasta mărind gradul de virulență. De asemenea glicocalixul inhibă pătrunderea în celule a medicamentelor antimicrobiene ca și acțiunea anticorpilor asupra celulelor bacteriene. În cazul bacteriilor din sol, prezența capsulei contribuie la formarea agregatelor din structura solului;
- funcția majoră este cea de aderență (atașare a bacteriilor la diferite suprafețe pentru a supraviețui în mediul natural). Prin adeziune bacteriile se atașează de pietrele din apele curgătoare, de rădăcinile plantelor, de dinți și țesuturi la om, de alte bacterii formând asociații coloniale cu efect beneficial pentru parteneri. În unele cazuri aderența este strict specifică datorită posibilei

selectivităţi a glicocalixului. Procesul de ataşare la diferite suprafeţe implică astfel atât colonizarea iniţială a unor situsuri specifice prin acţiunea adezinelor, cât şi o adeziune nespecifcă. Imaginile în relief obţinute la microscopul electronic cu baleiaj (*scanning*) relevă că majoritatea suprafeţelor în natură sunt acoperite de un biofilm alcătuit din bacterii incluse într-un film suţinut de polimerii adezivi secretaţi de acestea. Fenomenele de adeziune bacteriană prezintă un interes deosebit în studiul solului şi proceselor de coroziune, în microbiologia cavităţii bucale (placa dentară şi formarea cariei), în studiul bolilor infecţioase (endocardita, osteomielita, infecţiile tractusului urinar) şi in rezolvarea problemelor ridicate de colonizarea persistentă a cateterelor de plastic (Fig. 25), sondelor intrauterine, etc.

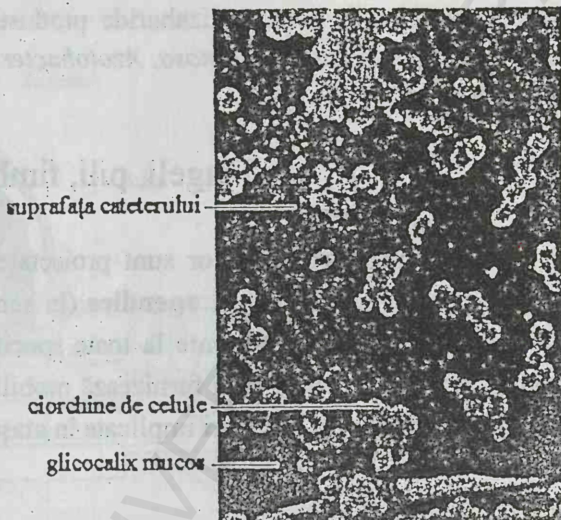


Fig. 25. Microelectronografie în relief a bacteriei *Staphylococcus aureus* ataşate de un cateter.

Dintre numeroasele utilizări practice ale exopolizaharidelor bacteriene în industrie şi medicină menţionăm:

- ca pansament al rănilor, înlocuitor de plasmă sanguină, suport pentru diferite substanţe absorbante utilizate în industria biochimică şi farmaceutică (dextranul, homopolizaharid produs de exemplu de *Leuconostoc mesenteroides*);
- ca stabilizator şi agent de gelificare în industria alimentară, ca floculant în epurarea apelor, ca agent de îngroşare a apelor de injecţie utilizate în recuperarea secundară a ţiţeiului din zăcăminte (xantanul, heteropolizaharid produs de exemplu, de *Xanthomonas campestris*);
- pentru fixarea coloranţilor în industria textilă, pentru tratarea rădăcinilor de puieţi de arbori şi arbuşti în cursul transportului, pentru

incorporarea în diferite pomezi și creme utilizate în industria farmaceutică și cosmetică (alginații, heteropolizaharide produse de mai multe bacterii ca de exemplu: *Pseudomonas aeruginosa, Azotobacter chroococcum*).

Flageli, pili, fimbrii

Din suprafața bacteriilor sunt proiectate mai multe tipuri de structuri alungite, numite de unii autori **apendice** (în sensul de prelungire în exterior a unui corp), care nu sunt prezente la toate speciile. Ele pot fi divizate în două categorii majore: structuri care furnizează mobilitate celulei bacteriene (flagelii și filamentele axiale) și structuri implicate în atașare (fimbriile și pilii).

FLAGELII

Flagelul (Lat. <flagellum> = bici) procariotelor este un apendice cu o structură unică în lumea vie. Funcția sa primară este de a conferi celulei mobilitate sau autopropulsie, respectiv capacitatea de a se deplasa liber prin înot într-un mediu care conține apă. Arhitectura cu totul specială a flagelului bacterian nu poate fi evidențiată decât la măriri superioare care relevă alcătuirea din 3 părți distincte: **filamentul, cârligul și corpul bazal** (Fig. 26).

Filamentul este o structură helicală semirigidă, cu un diametru de aproximativ 20 nm pe toată lungimea care poate varia de la 1 la 70 μm. Este compus din proteine (**flagelină**) secretate în celula bacteriană și eliminate la exterior unde îl formează prin gruparea moleculelor isodiametrice după o simetrie helicală (proces de autoasamblare). Întrucât filamentul are o structură tubulară, moleculele de flagelină sunt eliberate în porțiunea goală a tubului și se deplasează până la periferie, unde se depun, respectând această simetrie helicală. Viteza de deplasare a moleculelor de flagelină este mai mică cu cât distanța parcursă este mai lungă, realizându-se astfel o autoreglare a lungimii filamentului. Filamentul este inserat în cârlig și reprezintă porțiunea exclusiv extracelulară a flagelului.

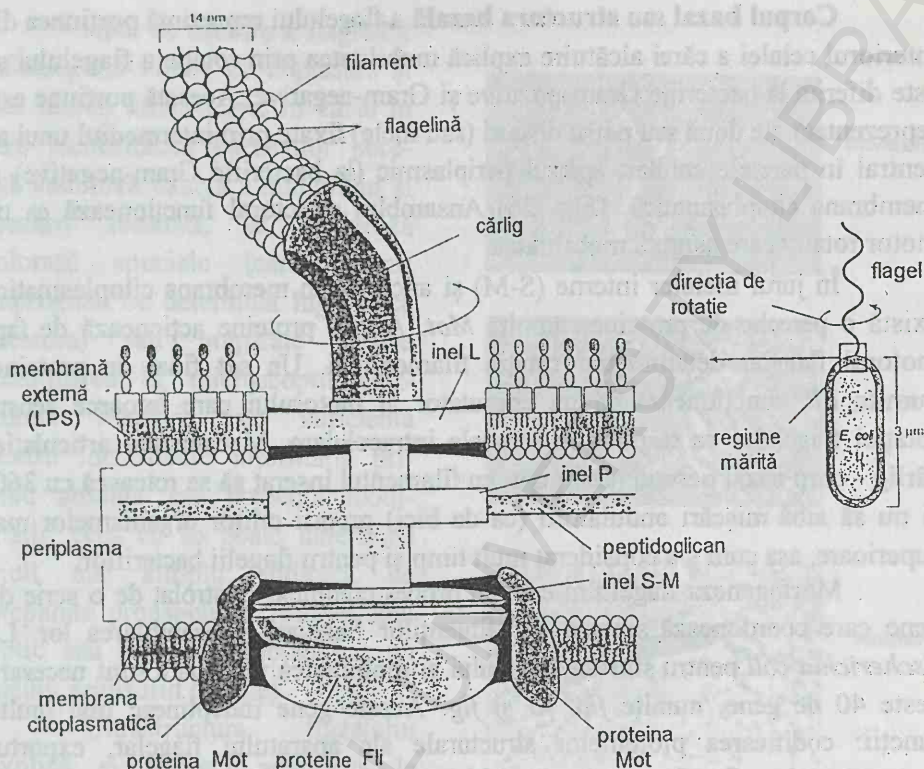


Fig. 26. Structura flagelului procariot și atașarea lui în peretele celular și membrană la o bacterie Gram-negativă (*Escherichia coli*). Deși celulele de *E. coli* sunt peritriche, pentru simplitate este prezentat un singur flagel. Inelul L este inclavat în stratul L.P.S. și inelul P în peptidoglican. Inelul S-M este inclavat în membrana citoplasmatică. Proteinele Mot funcționează ca un motor flagelar, în timp ce proteinele Fli funcționează ca un comutator al motorului (vezi textul pentru detalii).

Cârligul tubular, curbat, poate fi asimilat din punct de vedere funcțional unei articulații flexibile din structura motoarelor. Flexibilitatea cârligului permite filamentului helical să aibă o poziție perpendiculară față de perete și de asemenea permite filamentelor paralele (când este vorba de mai mulți flageli) să se rotească sub forma unui grup agregat. El este ancorat de celulă prin corpul bazal, care la rândul său este ancorat în peretele celular și membrana celulară.

Corpul bazal sau **structura bazală** a flagelului reprezintă porțiunea din interiorul celulei a cărei alcătuire explică mobilitatea prin rotație a flagelului și, este diferită la bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative. Această porțiune este reprezentată de două sau patru discuri (sau inele) fixate prin intermediul unui ax central în peretele celular, spațiul periplasmic (la bacteriile Gram-negative) și membrana citoplasmatică. (Fig. 26) Ansamblul structural funcționează ca un motor rotativ care asigură mobilitatea.

În jurul inelelor interne (S-M) și ancorate în membrana citoplasmatică există o pereche de proteine, numite *Mot.* Aceste proteine acționează de fapt motorul flagelar determinând rotația filamentului. Un set final de proteine, numite *Fli,* funcționează ca un comutator al motorului care întoarce sensul rotației flagelului ca răspuns la semnale intracelulare. Mecanismul articulației cârlig - corp bazal permite cârligului cu filamentul inserat să se rotească cu 360° și nu să aibă mișcări ondulatorii (ca de bici) proprii cililor organismelor mai superioare, așa cum s-a considerat mult timp și pentru flagelii bacteriilor.

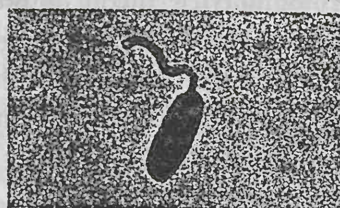
Morfogeneza flagelului este un proces complex, controlat de o serie de gene care coordonează sinteza constituenților flagelari și asamblarea lor. La *Escherichia coli,*pentru sinteza flagelului și mobilitatea ulterioară sunt necesare peste 40 de gene, numite *fla, fli* și *flg.* Aceste gene îndeplinesc mai multe funcții: codificarea proteinelor structurale ale aparatului flagelar, exportul componentelor flagelare prin membrană la exteriorul celulei și reglarea evenimentelor biochimice asociate formării noilor flageli. Controlul sintezei flagelului este riguros reglat în celulă, atât prin factori metabolici cât și prin semnale emise în ciclul de diviziune celulară.

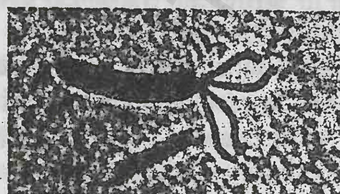
Prezența flagelului la bacterii este controlată genetic, iar capacitatea de a produce flageli poate fi pierdută prin mutație și redobândită prin retromutație. În general, toate bacteriile spiralate, aproape jumătate dintre formele bacilare și un număr mic de coci prezintă unul sau mai mulți flageli.

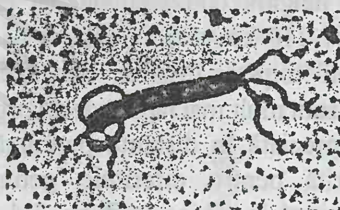
Numărul și aranjamentul flagelilor la suprafața bacteriilor diferă în principal după două modele: 1) aranjament polar, care corespunde situației în care flagelii sunt așezați la unul sau la ambele capete ale celulei și, poate fi de trei subtipuri: monotrich (gr. <trichos> = fir de păr), cu un singur flagel; lofotrich, cu un mănunchi de flageli pornind din același loc și amfitrich, cu flageli la ambii poli ai celulei. 2) aranjament peritrich, situație în care flagelii sunt dispersați la întâmplare pe înteaga suprafață a celulei (Fig. 27).

Tipul de așezare a flagelilor influențează viteza de deplasare și este util în identificare. În cazul în care identificarea bacteriilor necesită stabilirea exactă a numărului și așezării acestora, se utilizează colorații speciale (care permit impregnări ce determină îngroșarea acestora) sau preparate pentru examinarea la microscopul electronic. Deseori este suficientă pentru identificare informația privind absența sau prezența mobilității, ceea ce se poate determina mult mai simplu: indirect, pe preparate proaspete la microscopul optic sau prin însămânțare pe un mediu semisolid (moale).

Ultrastructura flagelului explică și reflectă adaptarea la mecanismul deplasării prin rotație. Filamentul se rotește ca o elice propulsând celula. Dovada evidentă a mișcării prin rotație poate fi obținută prin observarea comportării celulelor mobile fixate prin extremitatea liberă a flagelului de lame microscopice. Asemenea celule se rotesc punctului de atașare, cu viteze de revoluție comparabile cu cele realizate în cazul mișcării flagelului la celulele liber înotătoare. S-a demonstrat că celulele bacteriene se rotesc fie în sens orar, fie antiorar. Mișcarea rotatorie a flagelului este dirijată din corpul bazal care







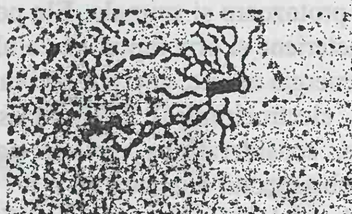


Fig. 27. Tipuri de aranjament al flagelilor. (a) Polar: monotrich, lofotrich și amfitrich. (b) Peritrich.

funcționează ca un motor. **Energia** necesară rotației flagelului este furnizată de **o forță protonmotrice**: fluxul de protoni care străbate membrana plasmatică prin complexul Mot (codificat de genele *mot* ale căror mutații paralizează flagelul) aplică o forță electrostatică discului bazal (rotor sau motor) al corpului bazal întocmai cum fluxul de electroni induce o forță magnetică într-un motor electric. S-a demonstrat prin calcule că pentru o singură rotație a flagelului trebuie să fie translocați aproximativ 1000 protoni. Experimentele de genetică moleculară sugerează că motorul flagelar conține aproximativ 16 unități independente generatoare de forță.

Flagelii nu se rotesc cu o viteză constantă, ci viteza lor rotațională poate fi mărită sau micșorată în relație cu intensitatea forței protonmotrice. Rotația flagelului poate deplasa bacteria prin medii lichide cu viteze de până la 60 lungimi de celulă/sec. Deși aceasta reprezintă numai aproximativ 0,00017 km/oră, dacă se compară această viteză cu a organismelor mari, în termeni de număr lungimi corp/secundă, ea este extrem de rapidă. Viteza maximă (de aproximativ 110 km/oră) a celui mai rapid animal, ghepardul, reprezintă numai 25 lungimi corp/sec. Astfel, dacă se ia în considerare dimensiunile, celulele procariote sunt mult mai rapide decât organismele mai mari.

Apreciată în distanță parcursă în unitate de timp, viteza de deplasare este diferită pentru diferitele genuri și specii de bacterii, de exemplu: 5,2 mm/minut la *Thiospirillum*; 3,4 mm/minut la *Pseudomonas aeruginosa*; 1,7 mm/minut la *Sporosarcina ureae*. Asemenea viteze sunt comparabile cu ale anumitor protozoare și animale. Ele pot fi explicate prin metabolismul intens al celulei bacteriene și prin faptul că celula bacteriană folosește pentru mobilitate o sursă de energie aparte, energie derivată din procesele chimioosmotice (energie protonică, electrochimică). Datorită aspectelor particulare ale deplasării celulei bacteriene, considerată ca un caz particular de înot, această deplasare este studiată sub aspectul biomecanic.

Flagelul bacterian exemplifică singurul caz de mișcare rotatorie cunoscut în biologie.

Funcționarea flagelului este **asociată fenomenului de chemotaxie**: deplasarea bacteriilor către surse potențiale de nutrienți sau alți stimuli chimici favorabili (substanțe atractante) sau îndepărtarea de substanțe chimice potențial dăunătoare (substanțe repelente). În mod corespunzător chemotaxia este pozitivă și respectiv negativă. S-a demonstrat că într-un mediu neutru (care nu modifică deplasarea) celula bacteriană se deplasează aleatoriu printr-o serie de deplasări în linie dreaptă, urmată de rostogoliri și alte deplasări în linie dreaptă.

Prin rotația flagelilor în sens antiorar, celula se deplasează în sens orar și are ca rezultat o deplasare în linie dreaptă. La diferite intervale deplasarea în linie dreaptă este întreruptă de rostogoliri în cursul cărora flagelii își inversează direcția și celula deviază de la cursul drept. Tipul de chimiotaxie (pozitiv sau negativ) este dependent de numărul de rostogoliri. Moleculele atractante inhibă rostogolirile și permit înaintarea spre stimul, iar cele repelente determină numeroase rostogoliri și îndepărtarea de stimul. (Fig. 28). Chemotaxia implică răspunsuri senzoriale specifice acționate chimic și care afectează funcția flagelului. Eficiența flagelului în dirijarea deplasării bacteriilor în mediu are la bază faptul că sistemul de detectare a substanțelor chimice este legat de mecanismul care deplasează flagelul. Membrana citoplasmică conține receptori specifici care leagă zaharuri și aminoacizi. Acești receptori (proteine senzoriale = proteine de chemotaxie metil acceptoare = MCP), reprezentați de proteine transmembranare funcționează ca transductori, în mare parte în mod similar cu receptorii pentru hormoni de pe celulele animale. La *Escherichia coli* sunt responsabile de majoritatea răspunsurilor trei dintre aceste proteine, numite după stimulatorii lor: *Tsr* (pentru serină), *Tar* (pentru acid aspartic), *Tgr* (pentru glucoză și riboză). Transducția semnalului este un mecanism de reglare

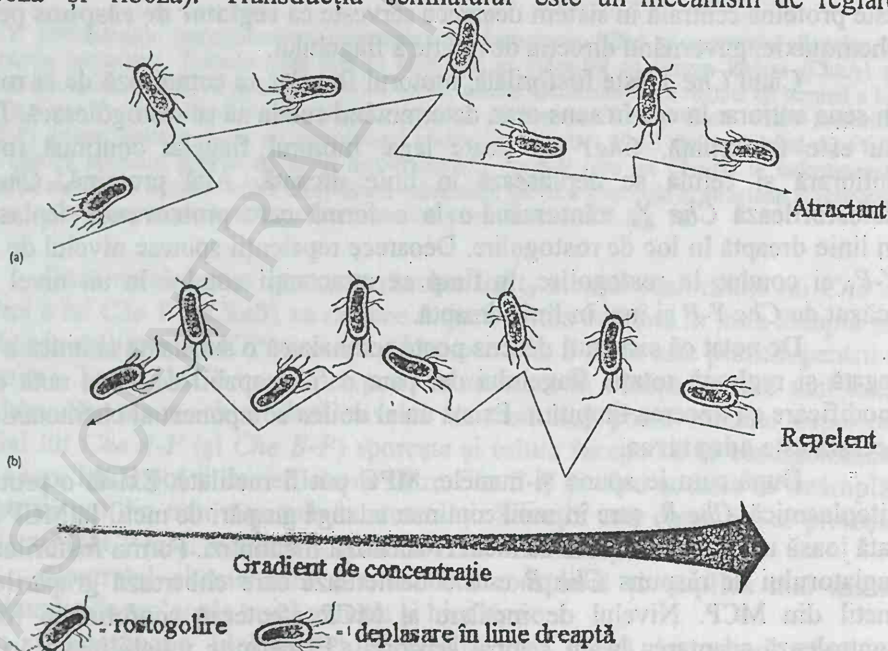


Fig. 28. Chimiotaxia la bacterii: deplasarea către stimulii pozitivi (a) și îndepărtarea de stimulii chimici iritanți (b) prin înaintarea în linie dreaptă întreruptă de rostogoliri.

important atât la procariote cât și la eucariote. La procariote transducția semnalului implică tipic sisteme cu două componente: o proteină senzor localizată în membrană și o proteină citoplasmatică reglator a raspunsului. Proteina senzor este kinaza (enzimă care fosforilează compuși) și activitatea reglatorului de răspuns depinde de starea sa de fosforilare. Spre deosebire de majoritatea sistemelor cu două componente, cel care reglează chemotaxia bacteriană operează la nivelul activității (nu sintezei) proteinei.

Modelul actual al controlului flagelar arată că transductorii sunt în contact cu proteinele citoplasmatice *CheW* și *CheA* (produși ai genelor che) (Fig. 29). *Che A* este senzor kinaza în acest sistem de reglare cu două componente. Când un transductor a legat o substanță chimică, el își modifică conformația și (cu *Che W*) determină o modificare în autofosforilearea lui *Che A* (formând (*Che A-P*). Atractanții descresc rata autofosforilării, în timp ce repelenții sporesc această rată. *Che A* fosforilat (*Che A-P*) fosforilează apoi *Che Y* (formând *Che Y-P*), un reglator de răspuns. *Che Y-P* interacționează cu motorul flagelar inducând rotația în sens orar a flagelului și rostogolirea.

Che A-P poate de asemenea fosforila *Che B,* alt reglator de răspuns, dar aceasta este o reacție mult mai înceată decât fosforilarea lui *Che Y*. Astfel *Che Y* este proteina centrală în sistem deoarece servește ca **reglator de răspuns** pentru chemotaxie, guvernând direcția de rotație a flagelului.

Când *Che Y* este fosforilată, motorul flagelar se comutează de la rotația în sens antiorar la cea în sens orar, determinând celula să se rostogolească. Dacă nu este fosforilată, *CheY* nu poate lega, motorul flagelar continuă rotația antiorară și celula se deplasează în linie dreaptă. Altă proteină, *Che Z*, defosforilează *Che Y*, reîntorcând-o la o formă care promovează deplasarea în linie dreaptă In loc de rostogolire. Deoarece repelenții sporesc nivelul de *Che Y-P*, ei conduc la rostogolire, în timp ce atractanții conduc la un nivel mai scăzut de *Che Y-P* și înot în linie dreaptă.

De notat că sistemul descris poate semnala că o substanță chimică a fost legată și reglează rotația flagelului dar pare a fi incapabil de a lua notă de o modificare cu trecerea timpului. Există un al doilea component al chemotaxiei și aceasta este **adaptarea**.

După cum le spune și numele, MPC pot fi metilate. Există o proteină citoplasmică, *Che R*, care în mod continuu adaugă grupări de metil la MCP la o rată joasă utilizând ca donor de metil S-adenozil metionina. Forma fosforilată a reglatorului de răspuns *Che B* este o demetilază care eliberează grupările de metil din MCP. Nivelul de metilare al MCP afectează conformația lor și controlează adaptarea la un semnal senzorial. El permite restabilirea stării de semnalare a receptorului chiar dacă concentrația substanțelor chimice rămâne nemodificată.

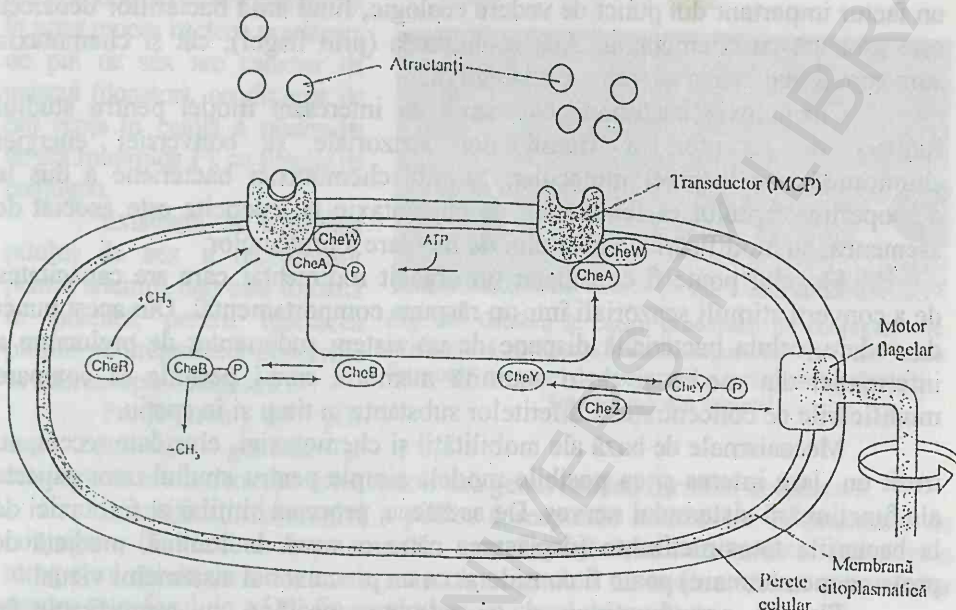


Fig. 29. Interacțiunile transductorilor, proteinelor de chemotaxie (Che) și motorului flagelar în chemotaxia bacteriană. Transductorul (MCP) formează un complex cu senzor kinaza (CheA) și proteina de cuplare CheW. Această combinație are ca rezultat autofosforilarea reglată de semnal a lui CheA la CheA-P. CheA-P poate apoi fosforila reglatorii de răspuns CheB și CheY. CheY fosforilat (CheY-P) interacționează direct cu comutatorul motorului flagelar. CheZ defosforilează CheY-P. CheR adaugă continuu grupări de metil transductorilor. CheB-P (dar nu Che-B) le îndepărtează. Gradul de metilare a transductorilor controlează capacitatea lor de a răspunde la atractanți și repelenți și conduce la adaptare. Structura motorului a fost prezentată în Fig. 26.

Dacă nivelul unui atractant rămâne înalt, nivelul fosforilării lui *Che A* (și deci a lui *Che Y* și *CheB*) va rămâne scăzut, celula va înota în linie dreaptă și, nivelul de metilare al MCP va crește (deoarece *Che B-P* nu este prezent pentru a demetila). Totuși, MCP nu mai răspund la atractant în situația în care sunt total metilate. De aceea, chiar dacă nivelul atractantului poate rămâne superior, nivelul lui *Che A-P* (și *Che B-P*) sporește și celula începe să se rostogolească. Însă acum MCP pot fi demetilate de către *Che B-P* și când aceasta se întâmplă, receptorii pot din nou răspunde la atractanți. Situația este opusă în ce privește repelanții (MCP total metilate răspund cel mai bine la repelenți).

Controlul chemotaxiei este evident complicat și implică mai multe evenimente de reglare la nivel genetic și biochimic.

<u>Semnificația biologică a flagelului</u> este legată în primul rând de mobilitatea pe care o asigură bacteriilor în mediile lor naturale. Mobilitatea este

un factor important din punct de vedere ecologic, fiind utilă bacteriilor deoarece este asociată cu chemotaxia. Atât mobilitatea (prin flagel), cât și chemotaxia sunt supuse reglării și au valoare adaptativă.

Chemotaxia bacteriană constituie un interesant model pentru studiul funcției de receptor, a transducției senzoriale și conversiei energiei chimiomecanice la nivel molecular. Studiul chemotaxiei bacteriene a dus la descoperirea faptului că fenomenul de chemotaxie la leucocite este asociat de asemenea, cu modificări ale nivelului de metilare a proteinelor.

Flagelul poate fi considerat un organit rudimentar care are capacitatea de a converti stimuli senzoriali într-un răspuns comportamental. Din acest punct de vedere, celula bacteriană dispune de un sistem rudimentar de prelucrare a informației din mediu și de o anumită memorie care-i permite să compare modificările de concentrație a diferitelor substanțe în timp și în spațiu.

Mecanismele de bază ale mobilității și chemotaxiei, elucidate recent, au trezit un larg interes și ca posibile modele simple pentru studiul unor aspecte ale funcționării sistemului nervos. De asemena, procesul similar al fototaxiei de la bacteriile fotosintetizante (deplasarea către o sursă de lumină, mediată de proteine membranare) poate fi considerat ca un precursor al sistemului vizual.

Flagelii pot funcționa și ca adezine specifice cu semnificație în adeziunea celulelor bacteriilor patogene și de asemenea au rol de antigen, manifestând o specificitate serologică marcată la diferite tulpini bacteriene.

Pili și fimbri

Pilii și fimbriile sunt apendice filamentoase peri- celulare, neimplicate în mobi- litate, prezente în special la bacteriile Gram-negative. Pilii (lat. <pilus> = fir de păr) și fimbriile (lat. <fimbria> = fibră, franj) sunt structuri diferite din punct de vedere morfologic, biochimic, genetic și funcțional. (Fig. 30).

Pilii sunt structururi rigide, tubulare, alungite, prezente în număr redus (adesea unul singur) pe suprafața celulei bacteriene. Lungimea acestor filamente drepte poate atinge 20 µm, iar ϕ (extern) ~ 9 nm (mai mare decât al fimbriilor). Pilii sunt alcătuiți din molecule de **pilină** (o fosfoglicoproteină) care sunt sintetizate în celulă și prelucrate la nivelul membranei acesteia. Formarea pililor este codificată de gene (*factorul de transfer*) prezente în structura plasmidelor bacteriene. Pe suprafața lor și la extremități poartă receptori pentru anumiți bacteriofagi (fagii fără coadă, fagii filamentoși). Aceste particularități sunt proprii **pilului de sex** care funcționează ca o conductă prin care are loc schimb de material genetic între două bacterii. Pilul de sex este implicat în procesele de conjugare, împerechere între celule, permițând transferul parțial de ADN de la o

celulă (donator) la alta (receptor). În acest proces bacteria purtătoare de pili de sex are caracter de mascul (donator), condiționat de pre zența în celulă a plasmidei de sex (plasmida F), cu funcție de conjugon.

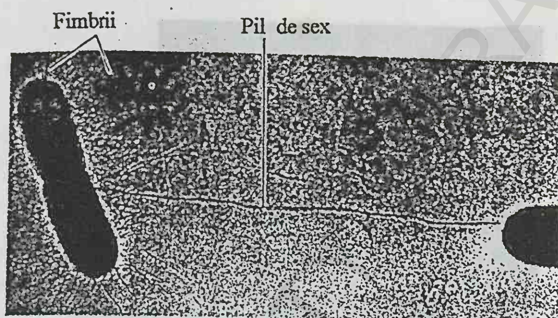


Fig. 30. Bacterii în cursul procesului de conjugare. Se evidențiază prezența unui singur pil de sex care formează un canal de conjugare și a numeroase fimbrii fine pe una din bacterii.

Existența la suprafața pilului de sex a receptorilor pentru anumiți fagi este folosită în practică pentru marcarea pilului pe preparatele observate la microscopul electronic.

Producerea de pili este controlată genetic și conjugarea are loc numai între specii sau genuri strâns înrudite de bacterii.

Semnificația biologică a pililor corespunde rolului lor în procesele de conjugare, fie servind drept structuri care fixează celula cu caracter femel și o atrag spre celula cu caracter de mascul, asigurând un contact direct intercelular pentru transferul de ADN fie servind ca un canal de conjugare.

Fimbriile sunt structuri filamentoase de lungimi diferite, prezente de regulă în număr mare pe suprafața a numeroase bacterii. Compoziția lor chimică exactă variază, majoritatea fimbriilor fiind alcătuite din proteine. Spre deosebire de flagel, fimbriile se formează prin adiție de molecule la bază. Sinteza lor este codificată de gene cromozomale. Nu prezintă la suprafață sau la extremități receptori pentru bacteriofagi. Fimbriile au tendința de alipire între ele și de diferite suprafețe. (Fig. 31).

La *Enterobacteriaceae* fimbriile sunt așezate obișnuit pericelular și în număr de la câteva până la 1000/celulă. La alte grupe de bacterii, fimbriile pot fi așezate polar sau bipolar. Lungimea lor este de 0,2 - 2,0 µm.

Diferitele tipuri de fimbrii pot fi clasificate după morfologie și după funcția lor cunoscută de adeziune la suprafețe specifice. O bacterie poate avea mai multe tipuri de fimbrii (1,2, etc.) care diferă ca grosime și lungime, specificitate antigenică, secvență proteică și specificitatea receptorului glicoproteic al celulei de care se atașează.

Unele bacterii patogene pot coloniza și infecta țesuturile gazdei datorită adeziunii prin fimbrii la celulele epiteliale. Această proprietate permite implantarea bacteriilor la nivelul unor mucoase expuse diferitelor acțiuni mecanice (tuse, flux de urină) care le-ar putea elimina.

Alte tipuri de fimbrii, specifice anumitor bacterii, sunt implicate în adeziunea la peretele celular al fungilor și plantelor.

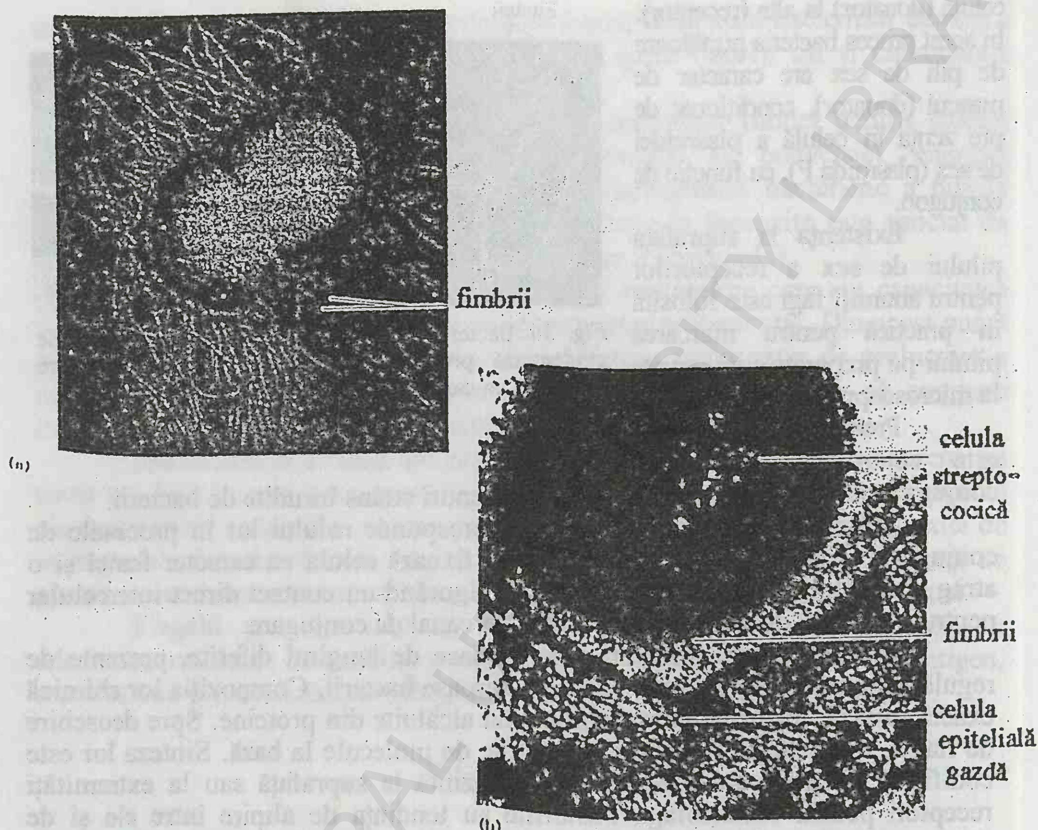


Fig. 31. Fimbrii bacteriene. (a) În jurul unei celule de *Streptococcus*. (b) Secțiune transversală prin tractusul respirator superior care evidențiază atașarea streptococului de celulele gazdă prin intermediul fimbriilor.

Fimbriile sunt de asemenea responsabile de colonizarea unor materiale solide: pietre, sticlă, celuloză, ceea ce duce la formarea biofilmelor și, prin asocierea bacteriilor fimbriate în medii lichide, la formarea de pelicule care plutesc la suprafața acestora. Peliculele de la suprafața apelor din natură de exemplu, favorizează multiplicarea bacteriilor aerobe în apele stagnante, puțin oxigenate. Nu este exclusă posibilitatea ca bacteriile din aceste adevărate asociații coloniale să facă o serie de schimburi de substanțe nutritive între ele, fimbriile jucând rol de canale de comunicare.

Se apreciază că fimbriile ar fi structuri adaptative care ar determina o mărire a suprafeței de contact cu mediul înconjurător. Ele ar fi utilizate pentru absorbția nutrienților. Această afirmație întregește semnificația lor biologică legată în esență de fenomenul de adeziune.

METABOLISMUL MICROBIAN. NUTRIȚIA ȘI CREȘTEREA MICROORGANISMELOR

Definiție; trăsături generale; principalele căi metabolice

Metabolismul (din gr. <metaballein> = modificare raportată la totalitatea reacțiilor chimice și activităților fizice ale celulei) reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice implicate în activitatea biologică a celulei microbiene, prin care substanțele din mediu sunt transformate în constituenți celulari, energie și produși de metabolism. Produșii de metabolism pot fi secretați sau excretați de celula microbiană și foarte mulți au o importanță deosebită pentru practică.

Activitățile metabolice furnizează o rezervă dinamică de blocuri de construcție chimică și dau naștere enzimelor și componentelor structurale ale celulei.

Metabolizarea nutrienților produce energie în formă de ATP ce poate fi canalizat în procese de biosinteză, transport, creștere, mobilitate.

Metabolismul este un proces ciclic cu autoreglare, care menține stabilitatea celulei (Fig. 32). Reacțiile metabolice sunt perfect coordonate pentru ca randamentul activității celulare să fie optim. Celula bacteriană se coordonează după principiul economiei sau al optimalității (al eficienței maxime). Reacțiile evoluează cu un consum minim de energie și utilizare maximă pentru biosinteze în scopul formării unui număr cât mai mare de celule într-o perioadă de timp. Ponderea numerică este condiția fundamentală pentru existența bacteriilor în natură, strategia lor de supraviețuire, care le permite să competiționeze cu alte organisme din mediu și cu condițiile adverse ale mediului. Ritmul de multiplicare foarte mare este explicat printr-un metabolism foarte activ.

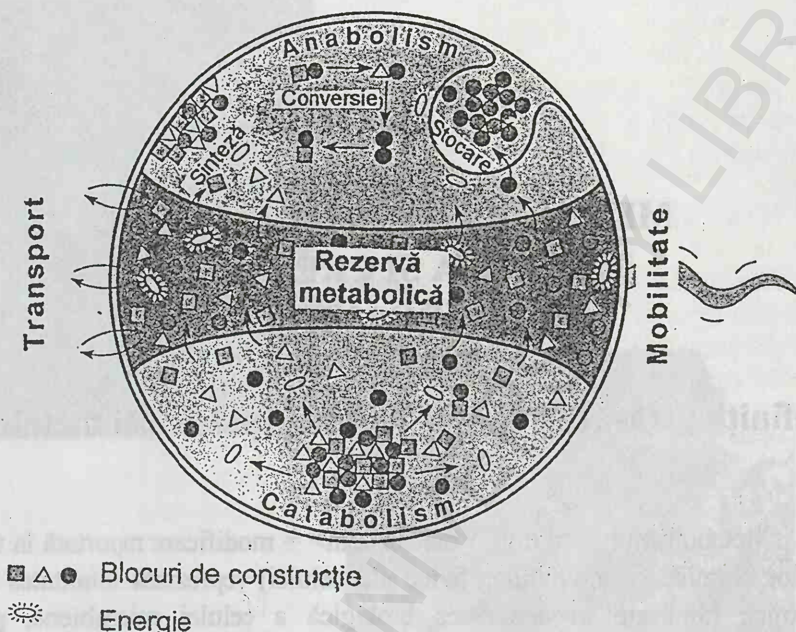


Fig. 32. Reprezentarea sumară a funcţiilor metabolice.

Cunoaşterea metabolismului celular este esenţială pentru înţelegerea biochimiei creşterii microorganismelor. De asemenea, cunoaşterea metabolismului conduce la dezvoltarea unor procedee de laborator pentru cultivarea microorganismelor şi la dezvoltarea procedeelor adecvate pentru împiedicarea creşterii microorganismelor nedorite. Deoarece numeroase consecinţe practice importante ale creşterii microorganismelor, cum ar fi bolile infecţioase sau obţinerea unor produşi utili sunt legate de metabolismul microbian, cunoaşterea nutriţiei şi metabolismului este de asemenea utilă în Microbiologia medicală şi industrială.

Căi metabolice

Reacţiile metabolice au loc de regulă în serii cu mai multe trepte, fiecare treptă fiind catalizată de o enzimă. Secvenţele de reacţii catalizate enzimatic sunt cunoscute şi sub denumirea de căi metabolice.

În general căile metabolice constau dintr-o secvenţă de reacţii chimice individuale care produc metaboliţi intermediari şi conduc la un produs final.

O cale individuală se manifestă în diferite moduri în funcție de scopul îndeplinit (Fig. 33). Produsul unei reacții constituie deseori reactantul (substratul) pentru următoarea, constituindu-se o reacție în lanț liniar. Numeroase căi prezintă ramificații care furnizează modalități alternative pentru prelucrarea nutrienților. Alte căi iau o formă ciclică, în care molecula start este generată pentru a iniția un alt tur al ciclului (de ex. ciclul ATC; Fig. 35). În general căile nu sunt de sine stătătoare, ci se intersectează fiind interconectate. Detaliile schemelor și căilor metaolice sunt complexe dar celula poate funcționa și supraviețui numai printr-o asemenea organizare chimică într-o rețea foarte complicată.

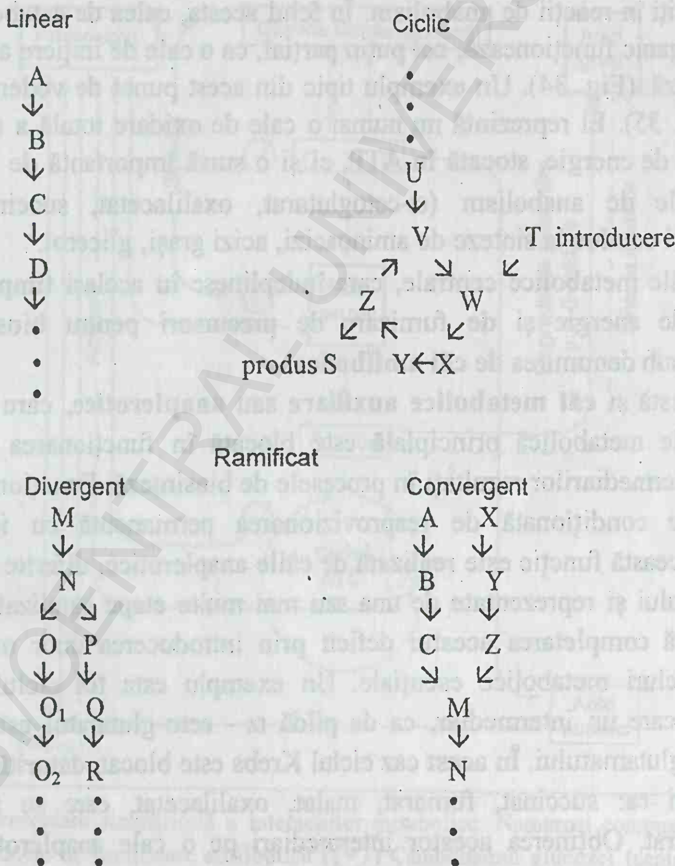


Fig. 33. Încadrarea căilor metabolice (sisteme multienzimatice) în mai multe tipuri: liniar, ciclic, ramificat.

În principal metabolismul microbian se realizează pe două căi care implică două tipuri de reacții:

1) reacții de degradare sau de **catabolism**, care se petrec cu eliberare de energie, fiind reacții exergonice (metabolism energetic) și

2) reacții de biosinteză sau de **anabolism**, care se petrec cu consum de energie, fiind reacții endergonice (metabolism de biosinteză).

Căile catabolice și anabolice funcționează simultan în celule.

În multe cazuri cele două tipuri de reacții sunt strâns legate, deoarece energia rezultată în procesele de catabolism este folosită în reacțiile de anabolism. De asemenea, o parte din produșii rezultați în procesul de catabolism pot fi folosiți în reacții de anabolism. În felul acesta, calea de catabolism a unui substrat organic funcționează, cel puțin parțial, ca o cale de inițiere a unor reacții de biosinteză. (Fig. 34). Un exemplu tipic din acest punct de vedere este ciclul Krebs (Fig. 35). El reprezintă nu numai o cale de oxidare totală a acetil - CoA cu formare de energie, stocată în ATP, ci și o sursă importantă de intermediari pentru căile de anabolism (α-cetoglutarat, oxalilacetat, succinat). Acești intermediari conduc la sinteze de aminoacizi, acizi grași, glicerol.

Căile metabolice centrale, care îndeplinesc în același timp, funcția de eliberare de energie și de furnizare de precursori pentru biosinteze sunt cunoscute sub denumirea de **căi amfibolice**.

Există și **căi metabolice auxiliare** sau **anaplerotice**, care apar atunci când o cale metabolică principlală este blocată în funcționarea ei, datorită folosirii intermediarilor rezultați în procesele de biosinteză. Funcționarea multor cicluri este condiționată de reaprovizionarea permanentă cu intermediarii utilizați. Această funcție este realizată de căile anaplerotice, diferite de cele ale catabolismului și reprezentate de una sau mai multe etape catalizate enzimatic care asigură completarea acestui deficit prin introducerea unor metaboliți în anumite cicluri metabolice esențiale. Un exemplu este tot ciclul Krebs, în situația în care un intermediar, ca de pildă α - ceto-glutaratul este folosit în biosinteza glutamatului. În acest caz ciclul Krebs este blocat, datorită lipsei altor intermediari ca: succinat, fumarat, malat, oxalilacetat, care se formau din α-cetoglutarat. Obținerea acestor intermediari pe o cale anaplerotică asigură aprovizionarea ciclului Krebs cu intermediarii necesari bunei lui funcționări mai departe.

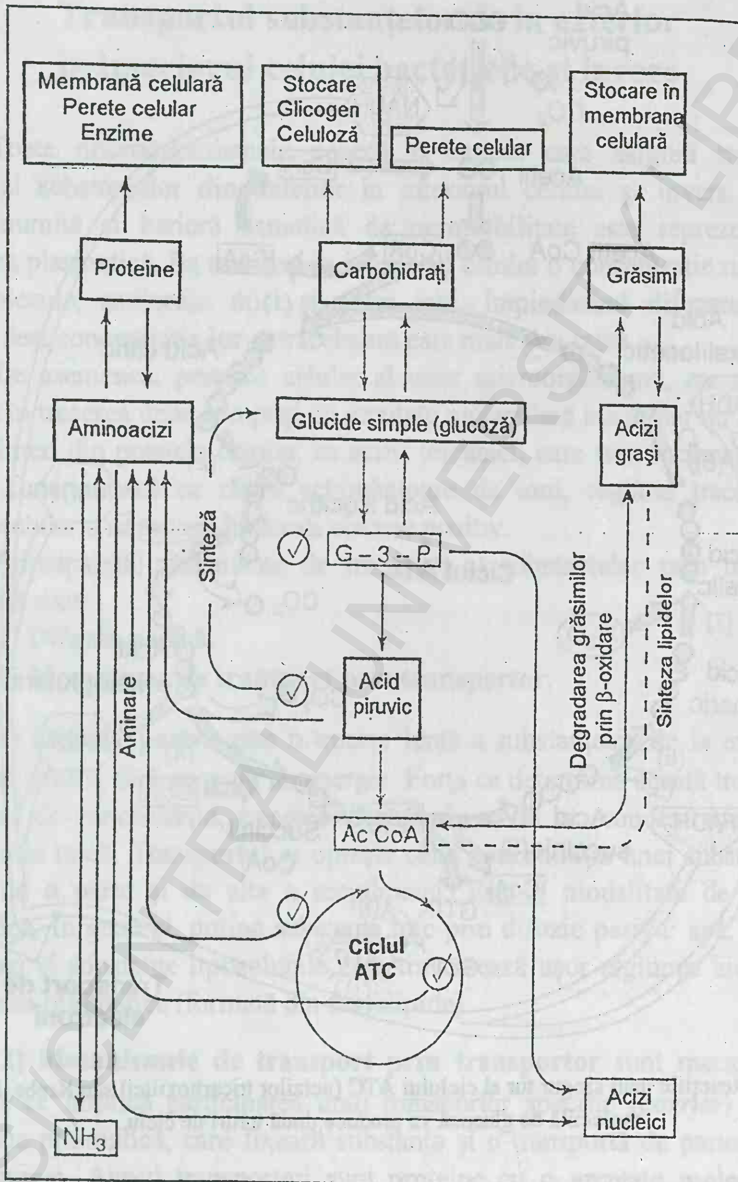


Fig. 34. Reprezentare simplificată a interacțiilor metabolice. Numeroși compuși intermediari servesc ca puncte de ramificare amfibolică (✓) Catabolismul glucozei (centru) furnizează numeroși intermediari pentru sinteza aminoacizilor, acizilor nucleici și hidrocarbonaților. La fel, moleculele formate în metabolismul lipidelor pot fi canalizate în ciclul ATC.

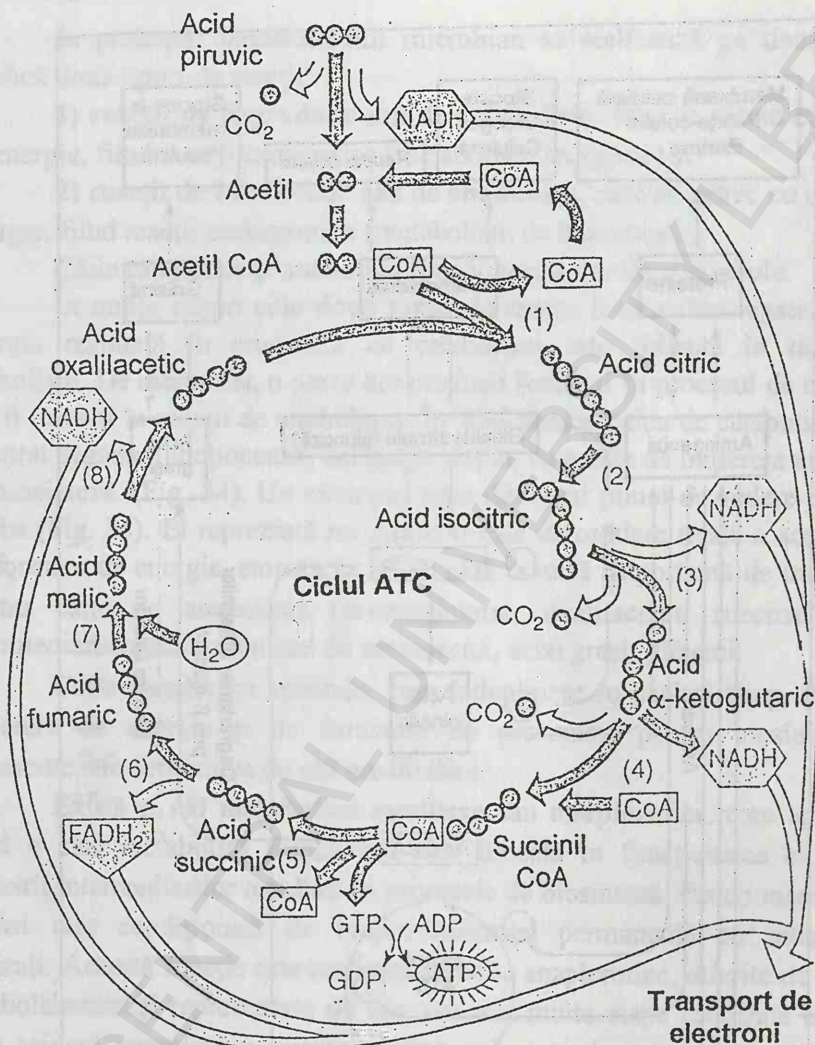


Fig. 35. Reacţiile unui singur tur al ciclului ATC (acizilor tricarboxilici) sau Krebs. Fiecare moleculă de glucoză va produce două tururi de ciclu.

Funcţionarea şi interacţiunea celor patru tipuri de căi metabolice sunt perfect coordonate astfel încât randamentul activităţii celulei să fie optim. Reacţii de tip special (*pace - maker*) reglează perfect diferitele interacţiuni prin intersecţia lor la punctele esenţiale.

Transportul substanțelor de la exterior în interiorul celulei bacteriene și invers

Toate microorganismele posedă o barieră care asigură transportul selectiv al substanțelor din exterior în interiorul celulei și invers. Această barieră, numită și barieră osmotică de permeabilitate este reprezentată de membrana plasmatică. Ea menține în interiorul celulei o concentrație ridicată de macromolecule, molecule mici și chiar ioni, împiedicând difuzarea lor la exterior, deși concentrația lor extracelulară este mult mai mică.

De asemenea, peretele celular al unor microorganisme, are o acțiune selectivă în trecerea unor compuși cu greutate moleculară mică, dar nu a tuturor. Unii polimeri din peretele celular, ca acizii teichoici, care sunt încărcați electric negativ, funcționează ca rășini schimbătoare de ioni, reglând trecerea prin peretele celular a unor ioni încărcați electric pozitiv.

Principalele mecanisme de transport al substanțelor prin membrana plasmatică sunt:

1) Difuzia pasivă.

2) Mecanisme de transport prin transportor.

1) Difuzia pasivă este o trecere lentă a substanțelor de la exterior la interior și invers, fără consum de energie. Forța ce determină această trecere este gradientul de concentrație, trecerea efectuându-se de la concentrația mare la concentrația mică. Transportul se oprește când concentrația unei substanțe este aceeași de o parte și de alta a membranei. Este o modalitate de transport nespecifică. În general, puține substanțe trec prin difuzie pasivă: apă, O_2, CO_2, acizi grași și substanțe liposolubile care traversează ușor regiunea hidrofobă a membranei plasmatice (formată din fosfolipide).

2) Mecanismele de transport prin transportor sunt mecanisme de transport ce implică participarea unui transportor specific (*carrier*) situat în membrana plasmatică, care fixează substanța și o transportă de partea cealaltă a membranei. Acești transportori sunt proteine cu o greutate moleculară de 30000 - 50000 daltoni.

Există 3 tipuri de procese de transport mediate prin proteine transportor: difuzia facilitată, transportul activ și translocarea de grup.

a) Difuzia facilitată este un proces ce se realizează fără consum de energie și ca urmare, nu se acumulează substanțe în celulă; concentrația lor este aceeași în celulă și în mediu. Forța de propulsie este tot gradientul de concentrație, trecerea efectuându-se de la concentrația mare la cea mică, până la stabilirea unui echilibru. Proteina transportor implicată în acest proces afectează numai viteza de difuzie, care este mai mare decât în difuzia pasivă, dar nu și echilibrul final. Glicerolul trece prin difuzie facilitată.

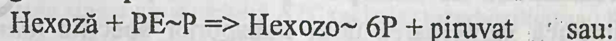
b) Transportul activ este un proces foarte specific, care se realizează cu consum de energie și împotriva gradientului de concentrație, adică de la o concentrație mică la o concentrație mare. Ca urmare, în acest proces se realizează o acumulare a substanțelor în celulă, de sute sau chiar mii de ori mai mult, față de mediul exterior. Cuplarea energiei se face la nivelul proteinei transportor, care conține un situs de legare complementar pentru substratul respectiv. Transportul activ constituie modalitatea majoră la bacterii pentru glucide, aminoacizi și săruri minerale.

c) Translocarea de grup este un proces în care substanța care este transportată suferă o modificare chimică la trecerea prin membrană, astfel încât substanța care a pătruns în celulă, nu mai este aceeași cu cea inițială. Procesul se realizează cu consum de energie și cu participarea sistemului enzimatic fosfotransferazic (PTS). În acest caz, în celulă are loc o acumulare de substanță modificată, nu de substanță inițială.

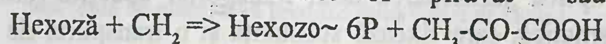
Translocarea de grup este implicată în transportul glucidelor simple (hexoze în special), care, la bacterii sunt acumulate ca derivați fosforilați și anume, ca esteri 6 - fosfat (glucozo-6-fosfat), cu excepția fructozei, care este transportată ca fructozo-1-fosfat.

Translocarea de grup mai este implicată și în transportul adeninei și a altor purine. Energia necesară procesului este furnizată de fosfoenolpiruvat (PEP), care conține o legătură macroergică de fosfat.

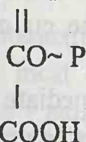
Ecuația globală a procesului este:



Hexoză + PE~P => Hexozo~ 6P + piruvat sau:



Hexoză + CH_2 => Hexozo~ 6P + CH_3-CO-COOH

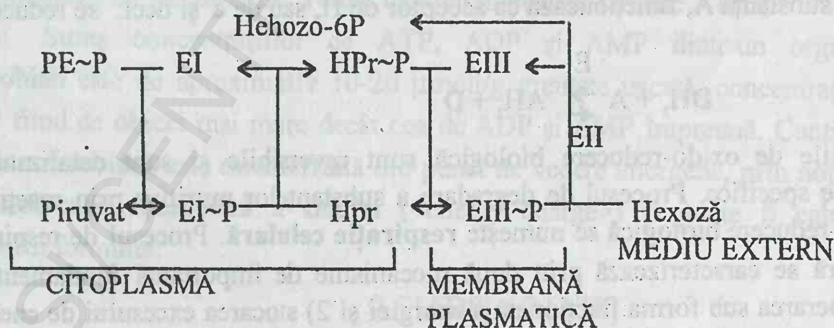


||
CO~ P
|
COOH

Procesul este însă mult mai complex și se petrece în 2 etape: prima etapă are loc în citoplasmă, iar a doua în membrana plasmatică.

În etapa care se petrece în citoplasmă, legătura macroergică de fosfat este transferată la enzima I (EI), o enzimă nespecifică, reacția catalizată de ea fiind aceeași la toate bacteriile. Enzima este activată de Mg^{2+}, Mn^{2+} și Co^{2+}. De la EI legătura macroergică de fosfat este transferată la o proteină mică, termostabilă, notată Hpr, care servește ca transportor de legături macroergice de fosfat. Un număr de astfel de Hpr proteine de la bacterii au fost examinate în detalii și toate au greutate moleculară de 9000 daltoni. Denumirea H provine, după unii autori de la histidină, după alți autori de la cuvântul englez <heat> (=căldură), ele fiind proteine termostabile. Gruparea macroergică de fosfat se leagă de N-1 al unui rest de histidină din Hpr.

În a doua etapă care se petrece în membrana plasmatică, intervine sistemul fosfotransferazic (PTS) format din enzimele EIII și EII, care sunt asociate cu membrana plasmatică. EIII este o proteină membranară periferică, aflată pe fața internă a membranei plasmatice, pe când EII este o proteină integrată a membranei plasmatice și o enzimă specifică pentru fiecare glucid și pentru diferite bacterii.



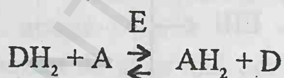
Gruparea macroergică de fosfat este transferată de la Hpr la EIII și de la aceasta la hexoză în prezența EII. În felul acesta hexoza pătrunde în celulă ca hexozo~6P.

Reacțiile de catabolism (Metabolismul energetic)

Căile catabolice sau de dezasimilație sunt reprezentate de procese biochimice implicate în degradarea diferiților nutrienți preluați din mediu și eliberare de energie în celulă cu scopul utilizării ei pentru activitatea celorlalte căi metabolice și fiziologice ale celulei bacteriene. Numărul reacțiilor enzimatice și complexitatea lor variază în funcție de produsul supus degradării. La modul general, căile catabolice evoluează în două faze. În prima fază, macromoleculele sunt descompuse pe cale enzimatică în unitățile lor de construcție: proteinele în aminoacizi, lipidele în glicerol și acizi grași iar glucidele în zaharuri simple (hexoze și pentoze). Faza se realizează deseori în afara celulei bacteriene și este rezultatul activității enzimelor extracelulare (exoenzime) pe care celula le secretă și le elimină în spațiul pericelular. În această fază se eliberează mai puțin de 1% din energia totală a macromoleculelor, care se pierde în bună parte, sub formă de căldură.

În faza a doua, substanțele sunt degradate mai departe, fie parțial, fie total până la CO_2 și H_2O, cu formarea unei cantități de energie, care va fi folosită de celulă în procesele de biosinteză.

Această degradare se face printr-o serie de reacții de oxido-reducere, în care, o substanță D, funcționează ca donor de H sau de e^- și deci, se oxidează, și o altă substanță A, funcționează ca acceptor de H, sau de e^- și deci, se reduce:



$$DH_2 + A \overset{E}{\rightleftarrows} AH_2 + D$$

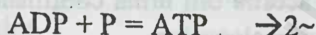
Reacțiile de oxido-reducere biologică sunt reversibile și sunt catalizate de enzime specifice. Procesul de degradare a substanțelor nutritive prin reacții de oxido-reducere biologică se numește **respirație celulară**. Procesul de respirație celulară se caracterizează prin două mecanisme de importanță fundamentală: 1) eliberarea sub forma fracționată a energiei și 2) stocarea excesului de energie în vederea unei utilizări ulterioare.

1) Spre deosebire de combustie, în care, eliberarea energiei este brutală, în procesele de oxido-reducere biologică, acest fenomen se desfășoară în mai multe etape, ceea ce determină o degajare succesivă, pe fracțiuni, a energiei

totale susceptibilă de a fi pusă în libertate. Aceasta se datorează faptului că respirația celulară se realizează prin intermediul a o serie de oxido-reduceri succesive, catalizate de enzimele respiratorii, care alcătuiesc **sistemul transportor de electroni** sau **catena de respirație celulară** și în cursul cărora, atomii de H, sau e^- sunt transportați la substratul acceptor, pa calea unui întreg lanț de reacții cuplate.

2) Energia pusă în libertate de reacțiile de oxido-reducere ale catenei de respirație celulară este înmagazinată într-un produs special, din care, la nevoie, poate fi eliberată cu ușurință. Acest produs este un compus organic cu fosfor: ATP, iar înmagazinarea energiei se face sub forma unei legături intens energetice, numită legătură macroergică: ~. ATP derivă din AMP prin 2 fosforilări consecutive, deci conține 2~ :


AMP + P = ADP →1~


ADP + P = ATP →2~

Atât ATP, cât și ADP pot ceda cu ușurință fosforul și, în acest caz, legătura macroergică se rupe, iar energia ei latentă devine accesibilă celulei. Această energie este de 7,3 kcal/mol.

Alți compuși macroergici sunt: diferiți nucleosid-trifosfați în afara ATP și anume: GTP și UTP; acilfosfați ca: acetil fosfatul și fosfoenolpiruvatul și acetiltioesteri ca: acetil-CoA. Totuși cel mai important rămâne ATP.

Suma concentrațiilor de ATP, ADP și AMP dintr-un organism microbian este de aproximativ 10-20 μmoli/g greutate uscată, concentrația de ATP fiind de obicei mai mare decât cea de ADP și AMP împreună. Cantitativ, celula microbiană este caracterizată din punct de vedere energetic, prin noțiunea de **încărcare energetică a celulei** (<energy charge>) și poate fi calculată conform formulei:

$$E.C. = \frac{0,5\,[ADP] + 2\,[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

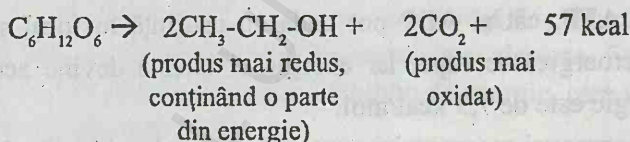
Folosind această formulă valorile pentru încărcarea energetică a unui microorganism variază între 0 - 1,0.

Tipuri de respirație celulară

După natura acceptorului final de e^-, deosebim 3 tipuri de respirație celulară: 1) fermentația; 2) respirația aerobă sau respirația; 3) respirația anaerobă.

Fermentația - este procesul de oxido-reducere biologică producător de energie, în care, substanțele organice funcționează atât ca donatori cât și ca acceptori de e^-.

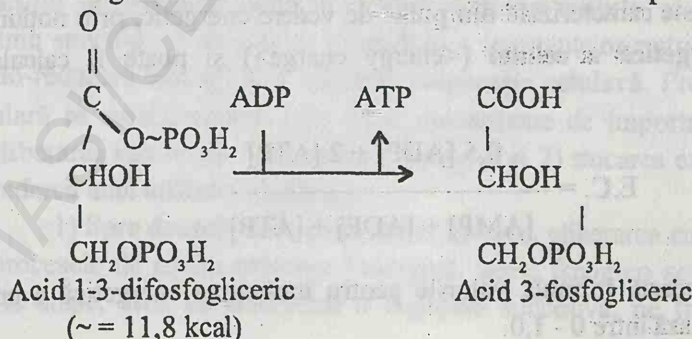
Compușii care îndeplinesc această funcție sunt de obicei 2 metaboliți diferiți, derivați dintr-un substrat fermentescibil, un zahar de exemplu. În procesul de fermentație, compușii organici sunt oxidați parțial și numai o cantitate mică de energie este eliberată, restul rămânând în produșii de fermentație. Ca urmare, în cursul fermentației, substratul dă naștere la un amestec de produși finali, dintre care, unii sunt mai oxidați decât substratul, iar alții, sunt mai reduși decât substratul, aceștia din urmă conținând și o parte din energie. De exemplu, în cazul fermentației alcoolice:



$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3\text{-}CH_2\text{-}OH + 2CO_2 + 57\ kcal$$

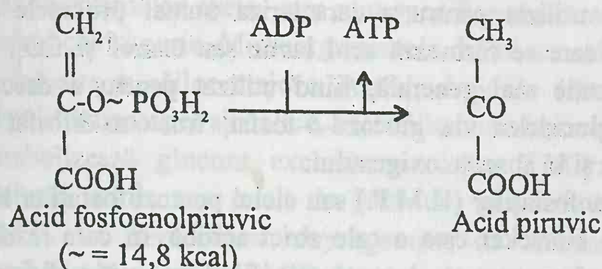
(produs mai redus, conținând o parte din energie) (produs mai oxidat)

Energia eliberată în cursul fermentației nu se pierde toată sub formă de căldură, ci o parte este conservată sub formă de ATP (26 - 30%), formându-se 2 ATP. ATP se formează în acest caz, prin transferul la ADP, a unei grupări de fosfat înalt energetice, de la un intermediar fosforilat, rezultat din degradarea substratului. Acest intermediar conține de regulă o legătură macroergică de valoare energetică mai mare decât cea din ATP. De exemplu:



Acid 1-3-difosfogliceric (~ = 11,8 kcal) Acid 3-fosfogliceric

sau:



Acid fosfoenolpiruvic
(~ = 14,8 kcal)

Acid piruvic

Acest mod de formare a ATP se numește **fosforilare la nivelul substratului** și este caracteristic proceselor fermentative.

Fermentația constituie modalitatea principală de procurare a energiei la bacteriile anaerobe și drojdii.

Glucidele reprezintă principalul substrat de fermentație, iar glucoza, forma principală în care glucidele sunt utilizate în metabolismul microorganismelor.

Pentru utilizarea glucozei în metabolismul microorganismelor au fost descrise 4 căi diferite, dintre care primele două sunt funcționale în celulele animalelor superioare, bacteriilor și fungilor, iar celelalte două funcționează în exclusivitate la bacterii. Aceste căi sunt:

a) calea EMBDEN - MEYERHOFF - PARNAS (E.M.P.) sau ciclul glicolizei
b) calea hexozomonofosfatului (H.M.P.)
c) calea ENTNER - DOUDOROFF (E.D.)
d) calea fosfocetolazei.

În toate aceste căi piruvatul ocupă poziția unui intermediar cheie, deoarece este situat la punctul de intersecție metabolică de la care pornesc diferitele căi terminale.

a) calea E.M.P. este calea majoră a catabolismului glucozei la cele mai multe microorganisme. Pe această cale, donorul de e^- este gliceraldehid-3-fosfatul, iar acceptorul final este fie acidul piruvic, cu formare de acid lactic, fie acetaldehida, cu formare de etanol. Numeroase microorganisme utilizează calea glicolizei până la piruvat, al cărui metabolism ulterior variază de la un grup la altul. La bacterii, calea EMP nu este obligatoriu o cale anaerobă de utilizare a glucozei. Aceasta explică schimbarea semnificației termenului de glicoliză, care

în forma sa originară era utilizat pantru a caracteriza numai procesele de fermentație anaerobă, prin care se formează acid lactic sau etanol și CO_2. În prezent, el are o semnificație mai generală, fiind utilizat pentru a descrie procesul de degradare a glucidelor via glucozo-6-fosfat, fructozo-difosfat și piruvat, atât în prezența, cât și în absența oxigenului.

b) calea hexozomonofosfaților (H.M.P.) sau ciclul pentozofosfaților sau calea Warburg - Dickens - Horecker este o cale strict aerobă, în care rezultă 1ATP pe moleculă de glucoză consumată. Această cale, fiind mai puțin eficientă din punct de vedere energetic (se obține 1/2 din cantitatea de ATP obținută în ciclul E.M.P.) este folosită de microorganisme în special pentru sinteza pentozofosfaților necesari în sinteza nucleotidelor și pentru producerea de $NADPH_2$, ca sursă reducătoare. Este o cale de „ocolire" a căii EMP de unde și denumirea „shunt"-ul H.M.P.

c) calea E.D. a fost descoperită la bacteriile aparținând anumitor specii ale genului *Pseudomonas*. Este prezentă în natură numai la bacterii și la unii viermi paraziți, ceea ce demonstrează că nu s-a păstrat de-a lungul evoluției organismelor. Și în această cale primul intermediar este glucozo-6-fosfatul, care este oxidat în același mod ca în calea HMP la 6-fosfogluconat. Ulterior, printr-o reacție de dehidrogenare, acesta formează un compus intermediar caracteristic, 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconat, care în ultima etapă este scindat la piruvat și aldehidă 3-fosfoglicerică. Aldehida 3-fosfoglicerică poate utiliza enzimele căii EMP, în care caz se formează piruvat și, totodată, 2 moli de ATP, sau pe cele ale căii HMP, situație în care calea furnizează precursori importanți pentru biosinteza de ADN, ARN, vitamine și acizi aromatici, fără producere de energie.

Căile E.M.P., H.M.P. și E.D. pot fi folosite alternativ sau în diferite combinații în funcție de anumite necesități ale metabolismului.

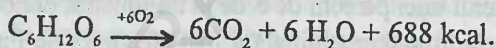
d) Calea fosfocetolazei este o cale care implică participarea unei enzime: fosfocetolaza, care scindează acetil-fosfatul, dintr-un compus cu C_5 sau C_6. Această cale, descrisă inițial la *Leuconostoc mesenteroides*, este prezentă numai la grupul limitat al bacteriilor lactice heterofermentative. Apare ca o variantă a căii H.M.P. cu care are primele 3 reacții în comun și de asemenea este mai puțin eficientă din punct de vedere energetic, rezultând 1 ATP pe moleculă de glucoză consumată.

Cele 4 căi de utilizare a glucozei sunt strâns interconectate, datorită faptului că au un număr important de compuși intermediari și enzime în comun,

în afara enzimelor cheie, care sunt specifice și determină caracterul particular al fiecărei căi în parte. Microorganismele diferă considerabil în ce privește gradul de folosire a căilor majore. Astfel, drojdiile (*Saccharomyces cerevisiae*) în timpul fermentației alcoolice, bacteriile homolactice și bacteriile strict anaerobe matabolizează glucoza exclusiv pe calea E.M.P. Când *S. cerevisiae* este cultivată aerob, mai mult de 30% din glucoză este metabolizată pe calea H.M.P. La *Penicillium chrysogenum*, de asemenea, 2/3 din glucoză este metabolizată pe calea H.M.P..

Respirația aerobă (respirația) este un tip de respirație celulară în care acceptorul final de electroni este oxigenul. Donatorul de electroni este o substanță organică sau anorganică. În cursul respirației, substratul este oxidat complet la CO_2 și H_2O. Caracteristica proceselor de respirație este faptul că, electronii eliberați prin oxidarea substratului sunt transferați la oxigen, prin intermediul unui sistem de enzime transportoare (**sistemul transportor de electroni** sau **catena de respirație celulară**). Catena de respirație celulară constă dintr-o serie de oxido-reduceri succesive, în cursul cărora se eliberează energie, care se stochează în ATP. Această modalitate de obținere a ATP, prin cuplare cu reacțiile de oxido-reducere se numește **fosforilare oxidativă** și este caracteristică respirației aerobe.

Ca bilanț energetic, energia rezultată în procesul de respirație este mult mai mare decât în cel de fermentație:



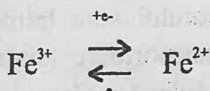
$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{+6O_2} 6CO_2 + 6\,H_2O + 688\ kcal.$$

Din aceasta, 39% este înmagazinată în molecule de ATP, iar restul se pierde prin căldură. Numărul de molecule de ATP este mult mai mare în respirație decât în fermentație și anume: în procesul de respirație se formează la procariote 38 ATP, dintre care, 34 prin fosforilare oxidativă și 4 prin fosforilare la nivelul substratului.

Sistemul transportor de electroni (catena de respirație celulară) este formată dintr-o serie de enzime, numite dehidrogenaze, ale căror coenzime servesc ca acceptori tranzitorii de H, sau electroni, de la un substrat donor la unul acceptor. Ordinea în care aceste enzime intră în catena de respirație celulară este aceea a potențialului lor redox, de la potențialul redox cel mai negativ, care este cel al electrodului de hidrogen ($E_0\ H_2 = -\ 0,42$ V), mergând spre potențialul redox cel mai pozitiv, care este cel al electrodului de oxigen ($E_0\ O_2 = +\ 0,81$ V).

În această ordine deosebim:

- Dehidrogenazele piridinice, ale căror coenzime: NAD și NADP funcționează ca transportori de hidrogen de la substrat (E_0 = -0,32 V).
- Dehidrogenazele flavinice, sau flavoproteinele, ale căror coenzime: FMN și FAD funcționează ca transportori de H de la NAD sau NADP la chinone (E_0 = -0,05V).
- Chinonele funcționează ca transportori de hidrogen de la flavoproteine la citocromi; cea mai cunoscută este ubichinona sau coenzima Q și este un derivat de benzochinonă (E0 = +0,122V).
- Citocromii sunt transportori de electroni, a căror coenzimă numită hem, conține Fe^{3+} , care poate fi redus, sau oxidat, în mod reversibil, prin câștigarea sau pierderea unui electron:



$$Fe^{3+} \underset{-e^-}{\overset{+e^-}{\rightleftarrows}} Fe^{2+}$$

Citocromii funcționează ca transportori de electroni de la chinone la oxigen. Există mai multe tipuri de citocromi, desemnate cu literele **b**, **c**, **a**, care intră în catena de respirație celulară în ordinea următoare: b (E_0 = -0,04 V)→ →c (E_0 = +0,26 V) → a (E_0 = +0,29 V) → a_3 (citocrom-oxidază) (E_0 = +0,55 V) → O_2.

Cuplată cu transferul de electroni are loc și sinteza de ATP în catena de respirație celulară. Transferul unei perechi de e^- de la un substrat donor la O_2 poate da naștere la 2 ATP, dacă dehidrogenarea inițială a fost efectuată de flavoproteine și 3 ATP, dacă dehidrogenarea inițială a fost efectuată de NAD sau NADP.

Transportorii de electroni specific bacterieni. La bacteriile anaerobe (*Clostridium pasteurianum*, bacterii butirice) se întâlnesc transportori de electroni de tip special cu potențial redox negativ și anume:

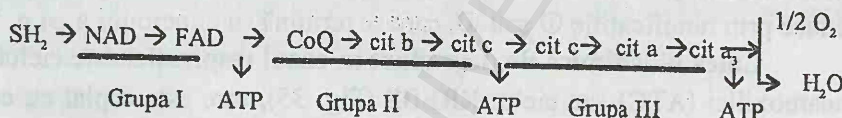
- Ferredoxina, de culoare brună, cu potențial redox foarte negativ (E_0 = -0,418 V), funcționează ca transportor de e^- între sistemul piruvat - dehidrogenazic (responsabil de formarea acetil - CoA și CO_2 din piruvat) și sistemul hidrogenazic, având rol în formarea H_2. Cea mai cunoscută, ferredoxina din *Clostridium pasteurianum* are greutate moleculară de ~ 6000 daltoni. Partea prostetică conține Fe nehemic și anume 8 atomi Fe / moleculă, sub formă de Fe^{3+}. Atomii de Fe sunt legați de partea proteică printr-o legătură covalentă cu grupările -SH ale cisteinei.

● <u>Rubredoxina</u>, de culoare roșie, cu potențial redox tot negativ (E_0 = -0,057 V). Conține Fe nehemic și anume 1 atom de Fe / moleculă, sub formă de Fe^{3+} și legat ionic de partea proteică, spre deosebire de ferredoxină. Rubredoxina poate substitui ferredoxina într-o serie de reacții.

● <u>Flavodoxina</u>, de culoare galbenă, cu potențial redox negativ (E_0 = -0,28 V). Nu conține Fe. Partea prostetică este FMN în proporție de 1 mol pe molecula de flavodoxină. FMN este legat de partea prostetică prin gruparea -SH a cisteinei. Flavodoxina înlocuiește ferredoxina, având rol în eliminarea H_2 și în fixarea N_2.

<u>Catena de respirație celulară la eucariote, comparativ cu cea de la procariote.</u>

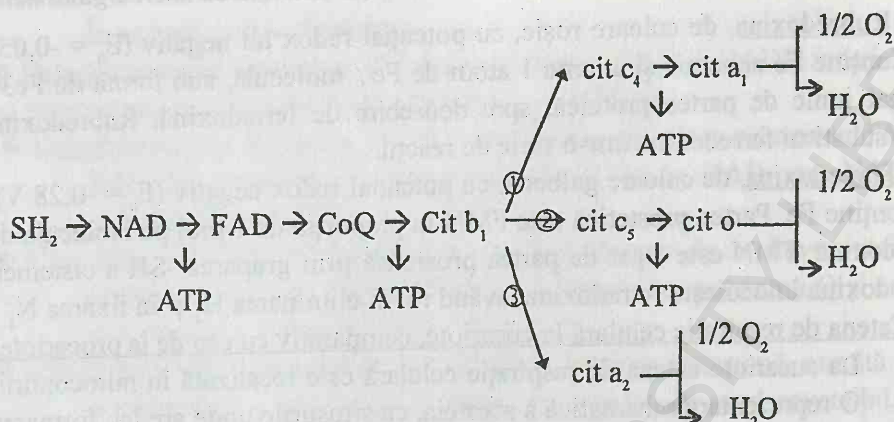
La eucariote catena de respirație celulară este localizată în mitocondrii. O reprezentare schematică a acesteia, cu situsurile unde are loc formarea ATP este următoarea:



Transportorii de electroni din catena de respirație celulară există în trei grupe separate notate cu I, II, III. Transportorii dintr-un grup au toți potențiale redox apropiate și de aceea, ei servesc împreună ca rezervă (*pool*) de potențial redox tampon. Numai când electronii sunt transportați de către un transportor dintr-un grup, la un transportor din alt grup, sau de la un transportor din grupa III la O_2, se crează suficientă energie pentru a se sintetiza ATP din ADP.

La procariote catena de respirație celulară se află localizată în membrana plasmatică și mezosomi. Transportorii de electroni de la procariote diferă într-o serie de privințe de cei de la eucariote. De exemplu, bacteriile sintetizează **citocromi tip c**, dar cu proprietăți diferite de cei de la eucariote, de aceea ei sunt desemnați ca **citocromi c_5** sau **citocromi c_4**. În plus, bacteriile sintetizează citocromi specifici, cum sunt **citocromii o**, capabili de a lega CO.

O altă deosebire importantă este faptul că la bacterii, catena de respirație celulară este adesea ramificată și se caracterizează prin prezența mai multor tipuri de citocromi terminali. Un exemplu în acest sens este catena de respirație celulară de la *Azotobacter vinelandii*, care posedă trei ramificații terminale, folosite de bacterie în funcție de condițiile de cultivare:



În condiții de aerare intensă transportul de e^- are loc prin ramificația ③ care se termină cu citocromul a_2. În condiții de aerare mai slabă, transportul de e^- se face prin ramificațiile ① sau ②, care se termină cu citocromii a_1 și o.

Calea biochimică de degradare în cazul respirației este ciclul acizilor tricarboxilici (ATC) sau ciclul KREBS (Fig. 35), care este cuplat cu catena de respirație celulară. În cazul în care substratul donor de e- este o substanță organică, aceasta este degradată mai întâi prin ciclul glicolizei, până la acid piruvic. Acesta intră apoi în ciclul Krebs, unde printr-o serie de reacții este oxidat până la CO_2 și H_2O. Pentru fiecare moleculă de acid piruvic care intră în ciclu rezultă: $3CO_2$, 4 $NADH_2$ și 1 $FADH_2$. $NADH_2$ și $FADH_2$ sunt reoxidate în catena de respirație celulară, cu formarea în final de apă și cu producere concomitentă de ATP prin fosforilare oxidativă.

<u>Bilanțul energetic la procariote și eucariote în cursul respirației</u>

La procariote se formează în cursul respirației 38 ATP, pe când la eucariote se formează 36 ATP. Explicația este: la procariote tot $NADH_2$ format atât în glicoliză, cât și în respirație, este oxidat direct în catena de respirație celulară, întrucât sinergonul respirației nu este compartimentat în organite ca la eucariote, ci este situat în membrana plasmatică și mezosomi, astfel încât întreaga celulă poate fi considerată ca sediu al respirației. Deci, pornind de la glucoză de exemplu, rezultă prin glicoliză 2 acid piruvic, care intră în ciclul Krebs. Prin urmare:

$NADH_2$ format în cursul glicolizei → 2$NADH_2$ (1)
$NADH_2$ format în cursul respirației → 4x2 = 8 $NADH_2$ (2)

FADH$_2$ format în cursul respirației → 1x2 = 2 FADH$_2$ (3)

ATP format prin fosforilare oxidativă: 2 NADH$_2$ (1) → 2x3ATP = 6ATP

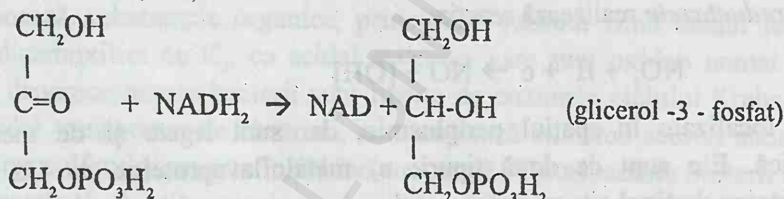
8 NADH$_2$ (2) → 8x3ATP = 24ATP

2 FADH$_2$(3) → 2x2ATP = 4ATP

Total = 34ATP

ATP format prin fosforilare la nivelul substratului în cursul glicolizei: 4ATP. Total ATP = 34 + 4 = **38 ATP.**

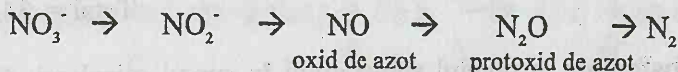
La eucariote, enzimele ciclului Krebs și ale fosforilării oxidative se află în mitocondrii, iar cele ale glicolizei în citoplasmă. Cele 2 molecule de NADH$_2$ formate în cursul glicolizei pot fi oxidate numai în mitocondrii. Dar mitocondriile sunt impermeabile pentru NADH$_2$. Ca atare, acesta se oxidează în citoplasmă pe seama dehidroacetonfosfatului:



Glicerol-3-fosfatul pătrunde în mitocondrii și este oxidat de o dehidrogenază flavinică (FAD) rezultând în acest caz 2ATP (se știe că din oxidarea NADH$_2$ în catena de respirație celulară rezultă 3 ATP, pe când din oxidarea FADH$_2$ rezultă 2ATP). Deci din cele 2 molecule de NADH$_2$ formate în cursul glicolizei vor rezulta la eucariote 2x2 = 4ATP în loc de 6ATP ca la procariote, iar totalul de ATP va fi: 4 + 28 + 4 = **36 ATP.**

Respirația anaerobă. Este un tip de respirație celulară în care acceptorul final de electroni este orice altă substanță anorganică în afara O_2. Donatorul de electroni poate fi o substanță anorganică sau organică. Ca acceptor de electroni pot funcționa: nitrații (NO_3^-), sulfații (SO_4^{2-}) și carbonații (CO_3^{2-}). Respirația anaerobă se întâlnește numai la bacterii.

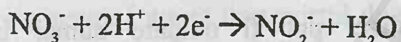
Acceptorii de electroni: ◆ **NO_3^-**. NO_3^- ca acceptor de electroni este redus mai întâi la NO_2^- și în final la N_2, proces numit **denitrificare**. Pentru fiecare moleculă de NO_3^- sunt necesari 5 e^-, conform ecuației globale: $2NO_3^- + 10\ e^- \rightarrow N_2 + 6\ H_2O$. Denitrificarea este rezultatul unui lanț de reacții și anume:



$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow \underset{\text{oxid de azot}}{NO} \rightarrow \underset{\text{protoxid de azot}}{N_2O} \rightarrow N_2$$

și are loc sub acțiunea a 4 sisteme enzimatice:

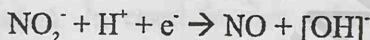
◆ *nitrat-reductazele de tip A* (de tip dezasimilator) aflate pe fața internă a mambranei plasmatice. Ele realizează reacția:



$$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$$

și se deosebesc de nitratreductazele de tip B (asimilator), care reduc NO_3^- la NH_3 în procesul de biosinteză.

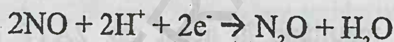
◆ *nitrit-reductazele* realizează reacția:



$$NO_2^- + H^+ + e^- \rightarrow NO + [OH]^-$$

și sunt localizate în spațiul periplasmic, dar sunt legate și de membrana plasmatică. Ele sunt de două tipuri: a) metaloflavoproteine cu Cu și b) hemoproteine de tipul citocromilor c și d.

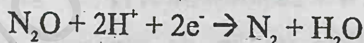
◆ *oxid nitric reductaza* realizează reacția:



$$2NO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2O + H_2O$$

Rolul ei este discutabil, ca de altfel și al oxidului de azot, deși unele date experimentale pledează pentru posibilitatea prezenței lui ca intermediar în denitrificare.

◆ *oxid nitros reductaza* realizează reacția:



$$N_2O + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2 + H_2O$$

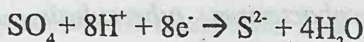
și este legată de membrana plasmatică.

Donatorii de electroni pot fi substanțe organice, care se oxidează complet la CO_2 sau substanțe anorganice ca H_2, S, care sunt oxidate la H_2O, SO_4^{2-}. În cursul procesului de denitrificare rezultă 2ATP prin fosforilare oxidativă.

Bacteriile care realizează acest proces sunt numite **bacterii denitrificatoare.** Ele sunt facultativ anaerobe, deoarece pot transfera electroni la oxigen când acesta este prezent, sau la NO_3^-, când oxigenul este absent.

Denitrificarea este un proces important reprezentând ultima etapă a circuitului azotului în natură: fixarea N_2 → amonificare → nitrificare → denitrificare. Este însă și un proces dăunător pentru sol dacă este extins, deoarece rezultă o pierdere a compușilor azotați importanți pentru fertilitatea solului.

Acceptori de electroni: ◆ **SO_4^{2-}**. Sulfatul ca acceptor de electroni este redus la H_2S, fiecare moleculă de sulfat putând accepta 8 e- :

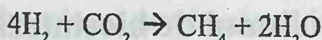


$$SO_4 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow S^{2-} + 4H_2O$$

Bacteriile care folosesc sulfatul ca acceptor final de electroni sunt numite **sulfat - reducătoare**. Această proprietate este întâlnită la unii vibrioni (genul *Desulfovibrio*) și unele bacterii sporulate din genul *Clostridium*. Toate aceste bacterii sunt obligat anaerobe. Ca donatori de electroni la aceste bacterii funcționează substanțele organice, principalul substrat fiind acidul lactic sau acizii dicarboxilici cu C_4, ca acidul succinic, care sunt oxidați numai până la acetat, deoarece aceste bacterii sunt lipsite de enzimele ciclului Krebs. Natura sistemului transportor de electroni, care cuplează oxidarea acestor substrate cu reducerea sulfatului nu este încă bine cunoscută. Totuși, aceste bacterii conțin o mare cantitate de citocrom c_3, un citocrom cu potențial redox foarte scăzut (E_0 = -0,25 V), care catalizează reducerea sulfatului la sulfit.

Ele conțin și ferredoxină, care se presupune că de asemenea joacă rol în sistemul transportor de electroni al acestor bacterii.

Acceptori de electroni: ◆ **CO_3^{2-}** sau **CO_2**. Un mic grup de bacterii strict anaerobe folosesc CO_2 ca acceptor final de electroni, reducându-l la metan. Acestea sunt **bacteriile metanogene**. Ca substrat donor de electroni folosesc H_2:



$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$$

Bacteriile metanogene nu conțin citocromi, dar au un conținut ridicat de vitamină B_{12} și acid folic, care sub formă de coenzime joacă un rol în procesul de reducere. Energia eliberată prin reducerea CO_2 la CH_4 duce la formarea a 2ATP pe molecula de CO_2 redusă. Reprezentanții acestui grup de bacterii (aparținând archaebacteriilor sau domeniului Archaea) sunt utilizați în biotehnologiile de obținere a așa numitului biogaz ca sursă neconvențională de energie.

Tipurile de respirație la microorganisme (după comportarea față de oxigenul molecular atmosferic)

În funcție de comportarea lor față de oxigenul molecular, microorganismele pot fi grupate în 4 tipuri respiratorii:

* **microorganisme strict aerobe**, care au nevoie pentru dezvoltarea lor de oxigenul molecular atmosferic, pe care-l folosesc ca acceptor final de electroni, în cursul respirației celulare. Aceste microorganisme au ca tip de respirație celulară: respirația - aerobă sau respirația. De exemplu: *Bacillus subtilis, B. thuringiensis, Mycobacterium tuberculosis, Azotobacter sp.*, mucegaiuri, microalge, majoritatea protozoarelor.

* **microorganismele strict anaerobe**, care nu se pot dezvolta în prezența oxigenului molecular, ci numai în lipsa acestuia. Tipul de respirație celulară este: fermentația, sau respirația - anaerobă. De exemplu: *Clostridium butyricum, Clostridium tetani, Lactobacillus sp., Desulfovibrio sp.*

* **microorganisme anaerobe, facultativ aerobe**, capabile să-și orienteze metabolismul în funcție de disponibilitățile în O_2. Au în general un metabolism de tip anaerob, dar pot trăi și în prezența O_2, având în acest caz, un metabolism aerob. Tipul de respirație celulară: în condițiile prezenței O_2, respirația; în lipsa O_2, fermentație, sau respirație - anaerobă. De exemplu: *Escherichia coli, Streptococcus sp., Staphylococcus sp.*, drojdiile.

* **microorganisme microaerofile**, au nevoie de o cantitate de $O_2 <$ decât aceea din aerul atmosferic. Tipul de respirație celulară: respirație cu tendință spre fermentație, sau respirație anaerobă. De exemplu: bacteriile spiralate (din genurile: *Spirochaeta, Leptospira, Thiospirillum*).

Reacțiile de anabolism (Metabolismul de biosinteză)

Procesele de anabolism (de asimilație) sunt procesele prin care microorganismele își sintetizează din molecule simple, constituenții celulari proprii ca: glucide, aminoacizi, acizi grași, baze azotate (purinice și pirimidinice) și macromolecule specifice. Sinteza macromoleculelor specifice: proteine, acizi nucleici și anumite polizaharide capsulare, este foarte eficientă și

se face sub acțiunea informației genetice furnizate de ADN celular. Celula bacteriană face sinteza monomerilor și apoi realizează procesul descris de Lwoff sub numele de *diataxie*: gruparea monomerilor într-o ordine specifică dictată de informația genetică. Specificitatea biologică este bazată pe aranjarea diferită în structura unui polimer a unui număr limitat de unități de construcție fundamentale și reprezintă o performanță unică a sistemelor biologice. În felul acesta structura primară (modul de aranjare a monomerilor) determină funcțiile specifice ale polimerului respectiv.

Pentru realizarea reacțiilor sale de biosinteză, celula microbiană folosește ATP format în procesele de catabolism. Însă nu tot ATP format în reacțiile de catabolism este folosit în biosinteze, ci și pentru: transportul substanțelor prin membrana plasmatică (transportul activ și translocarea de grup), chemotaxia asociată mobilității prin flagel, precum și pentru producerea de căldură.

Producerea de căldură are loc în reacțiile de biosinteză în care nu se consumă toată energia degajată de o legătură macroergică de fosfat din ATP. De exemplu: pentru sinteza unei amide sau a unui ester sunt necesare 3 kcal, deși se eliberează 7,3 kcal. Restul de energie se pierde sub formă de căldură. Producerea de căldură este o problemă importantă în industria microbiologică, deoarece este mai mare la microorganisme decât la organismele superioare. De exemplu: la *Escherichia coli* rata producerii de căldură este de 1 kcal/1h/g greutate uscată, pe când la *Drosophila* este de 0,1 kcal/1h/g și la om de 0,01 kcal/1h/g. Aceasta denotă că la microorganisme există o eficiență mai slabă a cuplării ATP cu reacțiile de biosinteză față de organismele superioare.

Pentru realizarea reacțiilor de anabolism, microorganismele trebuie să găsească în mediu o sursă de carbon, care cel mai adesea este și sursă de energie, precum și o sursă de azot, acestea putând fi de natură organică sau anorganică. Aceste substanțe pe care le găsesc în mediu, microorganismele le pot introduce direct în calea de biosinteză. Deoarece mediul înconjurător nu poate furniza microorganismului toți compușii necesari pentru reacțiile de anabolism, o serie de compuși intermediari formați în reacțiile de catabolism sunt preluați în reacțiile de anabolism. Așa sunt: acidul piruvic, acetil CoA, oxalilacetatul, α-ceto-glutaratul, succinatul, gliceraldehid-3-fosfatul, etc. Prin asimilarea surselor de carbon și azot, microorganismele își realizează nutriția.

Principalele tipuri de nutriție la microorganisme

Microorganismele pot fi caracterizate ca având diferite tipuri de nutriție în funcție de două criterii:

a) Natura sursei de carbon și azot folosită și capacitatea de sinteză a metaboliților esențiali;

b) Natura energiei folosite.

a) În funcție de acest criteriu deosebim două tipuri de nutriție: **autotrofă** și **heterotrofă**.

Autotrofia corespunde capacității de sinteză a tuturor metaboliților esențiali pornind de la substanțe anorganice simple, ca sursă de carbon și azot: CO_2, NH_3, NO_3^-, NO_2^- etc.

Heterotrofia implică incapacitatea de sinteză a unor metaboliți esențiali și decurgând din aceasta, nevoia obținerii lor din mediu ca substanțe preformate. Microorganismele care posedă acest tip de nutriție nu se pot dezvolta decât în prezența unor substrate organice, ca sursă de carbon și azot.

b) În funcție de acest criteriu deosebim tot două tipuri de nutriție: **fototrofia** și **chemotrofia**.

Fototrofia corespunde situației în care energia folosită în biosinteză este energia luminoasă. Acest tip de nutriție este caracteristic microorganismelor capabile de fotosinteză, numite **fotosintetizante** sau **fototrofe** (Photobacteria). După natura donatorilor de H^+ sau e^-, microorganismele fototrofe pot fi:

- **fotolitotrofe**, care folosesc ca donatori de H^+ sau e^- substanțe anorganice oxidabile; ele sunt în același timp *fotoautotrofe*, deoarece folosesc ca sursă de carbon și azot, tot substanțe anorganice (CO_2, NH_3 etc.).

◆ **fotoorganotrofe**, care folosesc ca donor de H^+ sau e^-, substanțe organice oxidabile; ele sunt în același timp și *fotoheterotrofe*, deoarece folosesc ca sursă de carbon și azot tot substanțele organice și numai rareori CO_2.

Principalele grupe de bacterii fototrofe sunt reprezentate de:

Oxyphotobacteria, capabile de fotosinteză oxigenică (cu formare de oxigen) cum sunt cianobacteriile. Aceste bacterii sunt fotolitotrofe, utilizând CO_2 ca sursă de carbon și H_2O ca donator de H^+ sau e^-. Ele formează ATP prin fosforilare neciclică, întocmai ca algele și plantele superioare. Sunt aerobe.

Anoxyphotobacteria, capabile de fotosinteză anoxigenică (fără formare de oxigen). Sunt fotolito- sau fotoorganotrofe. Fromează ATP prin fosforilare ciclică. Toate sunt anaerobe. În această categorie intră:

• bacteriile sulfuroase roșii (*Thiorhodaceae*), cu genul reprezentativ *Chromatium*;

• bacteriile sulfuroase verzi (*Chlorobacteriaceae*), cu genul reprezentativ *Chlorobium*;

• bacteriile nesulfuroase roșii (*Athiorhodaceae*), cu genul reprezentativ *Rhodospirillum*.

Chemotrofia corespunde situației în care energia folosită în biosinteză este energia chimică eliberată din reacțiile de oxido-reducere. Acest tip de nutriție este caracteristic microorganismelor capabile de chemosinteză, numite de aceea **chemosintetizante** sau **chemotrofe** și se întâlnește la majoritatea microorganismelor; în cazul bacteriilor, la *Scotobacteria* (gr. <skotos> = întuneric).

După natura donatorului de H^+ sau e^-, microorganismele chemotrofe pot fi:

◆ **chemolitotrofe** care folosesc ca donatori de H^+ sau e^- substanțe anorganice oxidabile; ele sunt în același timp *chemoautotrofe*, deoarece folosesc ca sursă de carbon și de azot tot substanțe anorganice (CO_2, NH_3, NO_3^-, etc.)

◆ **chemoorganotrofe**, care folosesc ca donor de H+ și e- substanțe organice oxidabile; ele sunt în același timp și *chemoheterotrofe*, deoarece folosesc ca sursă de carbon și azot tot substanțe organice.

Ținând seama în același timp de ambele criterii, adică, atât de natura sursei de carbon și azot, cât și de natura energiei folosite, principalele tipuri de nutriție pot fi sintetizate conform tabelului 5.

Tabelul nr. 5

Principalele tipuri de nutriție ale microorganismelor

Tipul de nutriție	Sursa de energie	Sursa de carbon	Donator de H^+ sau e-	Exemple
1. Fotolitoautotrof	Radiațiile luminoase	CO_2	H_2O, H_2S, S, H_2	Cianobacterii *Chromatium sp.* *Chlorobium sp.*
2. Fotoorgano-heterotrof	Radiațiile luminoase	substanțe organice, rar CO_2	substanțe organice	*Rhodospirillum*
3. Chemolito-autotrof	Oxidarea substanțelor anorganice	CO_2	NH_3, NO_2^-, H_2S, S, Fe^{2+}, H_2	Bacterii nitrificatoare Bacterii sulfoxidante Ferobacterii Hidrogen-bacterii
4. Chemoorganoheterotrof	Oxidarea substanțelor organice	substanțe organice	substanțe organice	Majoritatea bacteriilor și a altor microorganisme (levuri, mucegaiuri, protozoare)

Trebuie precizat că în ultima perioadă de timp conceptul de autotrofie este mai puțin restrictiv, în sensul că s-a propus ca în cadrul acestui concept să fie incluse atât microorganismele care asimilează CO_2 pe calea ciclului Calvin (autotrofele clasice) cât și microorganismele care folosesc alți compuși cu un atom de carbon: CH_4, CH_3-OH, CH_3-NH_2 (metan, metanol, metilamină), pe care îi asimilează pe calea ciclului ribulozomonofosfatului sau a ciclului serinei.

În același timp, grupul microorganismelor heterotrofe (care este majoritar) este foarte heterogen sub raportul exigențelor nutritive ale diferitelor specii. Unele heterotrofe au nevoie de o sursă organică de carbon și energie, dar își păstrează capacitatea de a folosi azot anorganic: NH_3, NO_2^-, N_2. Este cazul bacteriilor fixatoare de azot. Alte heterotrofe folosesc o sursă organică atât de carbon și energie, cât și de azot.

S-a demonstrat totodată că multe microorganisme considerate ca fiind autotrofe sunt în realitate facultativ autotrofe și că unele heterotrofe au capacitatea de a se adapta (atunci când substanțele organice lipsesc din mediu)

să utilizeze diferiți compuși anorganici. Această plasticitate a metabolismului microbian este un caracter adaptativ important, cu semnificație ecologică, deoarece în condiții naturale microorganismele nu dispun de condițiile oferite pentru dezvoltare în laborator.

Asocierea celor două tipuri de nutriție: autotrofă și heterotrofă, atât în ceeea ce privește substanțele necesare pentru biosinteze, cât și substanțele utilizate pentru producere de energie, este cunoscută sub denumirea de **mixotrofie**. Mixotrofia permite o mai bună adaptare a celulei bacteriene la condițiile în care nutrienții se găsesc în condiții foarte limitate și ilustrează că de fapt, cele două criterii care stau la baza diferențierii tipurilor de nutriție au mai mult un caracter didactic.

După toate probabilitățile mixotrofia reprezintă tipul de metabolism întâlnit cel mai adesea în mediile naturale, medii în care diferitele grupe de microorganisme nu trăiesc de altfel niciodată în stare izolată. De exemplu, populațiile bacteriene din natură nu sunt monospecifice ci totdeauna asociate, astfel încât necesitățile nutritive pot constitui baza unor relații ecologice, prin asocierea unor procese metabolice. Este ilustrativ cazul relațiilor de **sintrofie**, foarte frecvente în condiții naturale. În general însă, tipul de metabolism reflectă natura echipamentului enzimatic. Din acest punct de vedere se poate aprecia că autotrofele au un echipament enzimatic complex, ce le permite să folosescă substanțe foarte simple și pornind de la acestea să sintetizeze singure totalitatea constituenților celulari. Heterotrofele și-au pierdut capacitatea de a folosi molecule simple și în special carbon anorganic; metabolismul lor este dependent de un echipament enzimatic mai simplificat ce le permite să folosească o serie de materiale de construcție organice ca: aminoacizi, glucide, etc. Heterotrofia este inegală în sensul că la limita extremă a heterotrofiei se află microorganisme care nu pot folosi decât substanțe organice strict specializate pe care le iau ca atare din celulele organismelor vii. La această limită heterotrofia se întâlnește cu parazitismul, microorganismele cu acest tip de nutriție fiind parazite intracelular. Se consideră că heterotrofia este rezultatul unui proces de evoluție regresivă a organismelor, la care echipamentul enzimatic s-a simplificat, ceea ce înseamnă incapacitatea de sinteză a metaboliților esențiali.

Substanțele pe care microorganismele nu le pot sintetiza și trebuie să le găsească în mediu pentru a se putea dezvolta se numesc **factori de creștere**.

Factorii de creştere sunt deci substanţe care compensează incapacităţile de biosinteză. Deoarece primii factori de creştere cunoscuţi au fost vitaminele, aceştia se mai numesc şi *vitamine microbiene*. În această categorie însă, intră pe lângă vitamine (care funcţionează ca grupări prostetice ale unor enzime, ale unor proteine purtător sau cu activitate de coenzime) şi aminoacizi (necesari pentru sinteza proteinelor), purine şi pirimidine (utilizate pentru sinteza ARN, ADN şi a unor coenzime). Nevoia de factori de creştere există la toate microorganismele; deosebirea constă în modul lor de procurare. La microorganismele autotrofe aceşti factori de creştere sunt de provenienţă *endogenă*, pentru că microorganismul îi sintetizeză singur. La microorganismele heterotrofe unii factori de creştere sunt sintetizaţi de microorganisme, alţii nu, şi de aceea trebuie să-i găsească în mediu: sunt de provenienţă *exogenă*. Necesităţile în factori de creştere sunt de ordinul 10^{-4} M, adică în cantităţi foarte mici; este o necesitate *oligodinamică*. In afară de factorii de creştere există şi factori stimulatori ai creşterii. Aceştia sunt substanţe pe care bacteria şi le poate sintetiza, dar în cantitate insuficientă pentru o activitate normală.

Incapacitatea de sinteză a unui metabolit poate să apară şi în urma unui proces de mutageneză. Din acest punct de vedere, tulpinile izolate din natură, sau sălbatice, ce au un potenţial de sinteză mai mare, corespund **tipului de nutriţie prototrof**, tip de nutriţie primordial, pe când tulpinile ce şi-au pierdut o capacitate de sinteză în urma unui proces de mutageneză şi ca atare, trebuie să găsească substanţele respective în mediu se numesc **auxotrofe**. Microorganismele prototrofe au un echipament enzimatic complex, care le conferă capacităţi de sinteză multiple şi un mare grad de independenţă faţă de mediu. În condiţii de laborator prototrofele se dezvoltă pe medii minimale. Auxotrofia este rezultatul unei incapacităţi de sinteză care în mod obligatoriu trebuie compensată prin adăugarea în mediu a substanţei care nu poate fi sintetizată. Mutaţiile consecutive auxotrofiei determină apariţia unor enzime nefuncţionale, asfel încât celulele sunt defective pentru o anumită cale metabolică; nu se mai pot dezvolta pe mediu minimal decât dacă acesta este suplimentat cu substanţa pe care microorganismul nu o mai poate sintetiza. Pierderea unei capacităţi de sinteză reprezintă în acest caz , un marker genetic al celulei respective.

Odată cu stabilirea unităţii metabolice, a faptului că metabolismul bacterian cuprinde în general căi metabolice caracteristice sistemelor biologice,

domeniul nutriției bacterilor a devenit în primul rând de interes practic. Necesitățile specifice de creștere ale bacteriilor și levurilor pot fi utilizate în determinări cantitative ale aminoacizilor și vitaminelor cu ajutorul microorganismelor, realizate mult mai simplu decât la mamifere. Asemenea teste au fost utilizate pentru izolarea majorității vitaminelor esențiale pentru mamifere. S-a dovedit, de exemplu, că un factor de creștere pentru o specie de *Lactobacillus* este indentic cu un factor hematopoetic de la pacienții cu anemie pernicioasă (vitamina B_{12}).

Particularități specifice metabolismului bacterian

Sub raportul căilor metabolice centrale bacteriile folosesc mecanisme comune cu organismele superioare, constatare care a dus la stabilirea unității metabolice. Majoritatea căilor metabolice conoscute în Biochimie au fost descoperite inițial la microorganisme și apoi extrapolate la organismele superioare. Aceasta datorită avantajelor prezentate de bacterii: pot fi studiate sub formă de populații de celule individuale identice; pot fi obținute în cantități foarte mari; pot fi cultivate în medii sintetice și pot fi urmărite modificările pe care creșterea celulelor bacteriene le determină în mediu. Spre deosebire de concepția inițială a unui metabolism limitat, corespunzător structurii relativ simple a celulei bacteriene, în prezent se cunosc căi metabolice chiar mai complexe sau unice pentru bacterii, față de organismele superioare. De exemplu: sinteza antibioticelor, fixarea azotului molecular atmosferic, respirația anaerobă, fotosinteza anoxigenică.

În ansamblu, metabolismul bacterian se caracterizează prin următoarele particularități:

1) Intensitatea excepțional de mare, comparativ cu aceea a activităților omologe ale organismelor superioare. Această intensitate neobișnuit de mare a metabolismului bacterian se manifestă atât în ce privește capacitatea celulelor bacteriene de a descompune un substrat, cât și în ceea ce privește capacitatea de a sintetiza un compus. De exemplu: 1g. celule bacteriene aparținând speciei *Micrococcus ureae* descompun 180-1200g. uree pe oră, iar 1g. de bacterii lactice hidrolizează cca. 178-14890 g. lactoză pe oră. Aceasta înseamnă că celulele bacteriene pot metaboliza într-o oră o cantitate de substanță ce depășește de 1000-15000 de ori greutatea biomasei bacteriene. Există și date,

deși relative, ce ilustrează capacitatea enormă de sinteză. Această capacitate în cazul sintezei proteinelor, asociată cu capacitatea mare de multiplicare, explică utilizarea bacteriilor (ca și a levurilor) pentru producerea de biomasă celulară ca sursă neconvențională de proteină (cunoscută sub termenul de S.C.P. de la *„single cell protein"* sau mai corect S.C.B. de la *„single cell biomass"*). Din date teoretice, comparativ cu organismul bovinelor (luat ca etalon) care având o greutate de 500 kg fabrică în condiții normale 1/2 kg. proteine în 24 ore, 500 kg. masă bacteriană sintetizează în 24 ore între 5-50 t proteine. Deși diferitele condiții de mediu împiedică realizarea acestui potențial uriaș, acumularea unei cantități totuși foarte mari de biomasă bacteriană într-un interval foarte scurt, pe lângă alte avantaje, este utilizată în practică. O atare intensitate a activităților biologice, puțin comună în lumea vie, este posibilă datorită suprafeței foarte mari a celulelor bacteriene, în raport cu greutatea lor. Ca urmare, aceste organisme au o suprafață foarte mare de contact cu mediul înconjurător, deci de schimb de substanțe între celulă și mediu. Pe de altă parte, în natură există o regulă conform căreia, viteza metabolismului, de care depinde viteza creșterii, ar fi invers proporțională cu mărimea organismului. Ca atare, cu cât corpul unui organism este mai mic, cu atât metabolismul său este mai intens și creșterea sa mai rapidă. Excepționala viteză de creștere a bacteriilor reprezintă un avantaj biologic important pentru supraviețuirea populațiilor bacteriene în natură.

2) Varietatea potențialului biochimic în raport cu natura și diversitatea nutrienților folosiți. Considerate în ansamblu, microorganismele sunt cele mai tipic omnivore dintre toate organismele cunoscute, deoarece își pot realiza metabolismul folosind substanțe nutritive foarte numeroase și foarte diferite, pornind de la substanțe anorganice simple (N_2, CO_2, NH_3, NO_3^-, S) până la substanțe organice complexe. Aproape orice substanță din mediu, organică sau anorganică, din care se poate obține energie, este accesibilă metabolismului bacterian. Există microorganisme care pot folosi: acizii formic, oxalic, sulfuric, fenol, asfalt, parafină, petrol, chitină, piele, cauciuc, lemn, mase plastice, chiar antibiotice. Evident aceste capacități au numeroase implicații de ordin practic.

Totuși, în lumea bacteriilor există și mari diferențe individuale, în sensul că unele specii folosesc o gamă largă de nutrienți în timp ce altele sunt foarte specializate în folosirea numai a anumitor substanțe nutritive. De exemplu, *Pseudomonas fluorescens* utilizează între 70 - 200 compuși diferiți ca unică sursă de carbon și energie, în timp ce *Bacillus fastidiosus* folosește numai

acidul uric și compușii purinici înruditi. Există de asemenea grupe fiziologice de bacterii specializate, cum ar fi: bacteriile nitrificatoare care folosesc numai azotul mineral, azotul organic fiind toxic pentru ele; bacteriile celulozolitice care se dezvoltă în special pe celuloză ca sursă de carbon și energie; bacteriile fixatoare de azot folosesc în special azotul atmosferic ca o sursă de azot; bacteriile metilotrofe care nu pot să se dezvolte decât în medii care conțin metan și metanol.

3) Plasticitatea metabolismului microbian. Exprimă capacitatea microorganismelor de a se adapta la tipul și cantitatea de nutrienți diferiți, prezenți în mediu. *Escherichia coli*, de exemplu, datorită echipamentului enzimatic complex pe care-l posedă, utilizează nu numai glucoză și NH_3 ca surse de carbon și azot, ci o gamă largă de nutrienți, incluzând diferite alte glucide, glicerol, etanol, acetat, purine, pirimidine, aminoacizi. Metabolismul său funcționează după principiul maximei economii: bacteriile se dezvoltă mai repede în prezența aminoacizilor, decât pe săruri de amoniu. Când ambele surse sunt prezente în mediu, bacteriile utilizează preferențial aminoacizii și stopează sinteza lor; când aceștia s-au epuizat sau lipsesc din mediu, bacteria face sinteză de aminoacizi din sărurile de amoniu din mediu.

Metabolismul microbian are o mare mobilitate putând să se adapteze exigențelor mediului înconjurător, ca urmare a prezenței în celula bacteriană a unor căi alternative de realizare a catabolismului și a unor căi alternative de realizare a biosintezelor.

4) Diversitatea mecanismelor enzimatice și a produșilor obținuți. Microorganismele pot utiliza același substrat nutritiv, pe mai multe căi, fiecare din ele putând să ducă la formarea de produși diferiți. Oxidarea glucozei, de exemplu, se poate face pe calea glicolizei; pe calea hexozomonofosfatului sau pe calea Entner - Doudoroff. Diferitele căi metabolice pot coexista la același microorganism și se pot substitui una celeilalte, în funcție de condițiile fiziologice și de mediu.

Complexitatea fenomenelor biochimice este remarcabilă în lumea microorganismelor cu inepuizabilele lor posibilități de a modifica și de a sintetiza structurile chimice organice și anorganice cele mai diferite. Majoritatea combinațiilor organice și anorganice și chiar elemente chimice pot fi obținute prin catabolism sau anabolism microbian.

Studiul metabolismului microorganismelor are, pe lângă importanță teoretică, o importanță practică deosebită legată de posibilitatea de dirijare a biosintezelor, de utilizare a acestor complexe industriale în miniatură în realizarea unor procese de interes industrial și perfectarea acelora deja aplicate.

Mecanisme de reglare a metabolismului microbian

Reacțiile metabolismului decurg într-o manieră sistematică, perfect reglată, consecutivă utilizării la maximum a nutrienților și energiei disponibile. Celula răspunde la condițiile de mediu prin adoptarea acelor reacții metabolice care favorizează cel mai mult creșterea și supraviețuirea. Deoarece pentru desfășurarea acestor reacții enzimele sunt esențiale, reglarea metabolismului reprezintă de fapt, în sens larg, reglarea enzimelor printr-un sistem elaborat de reprimare și echilibrare.

Fiecare cale metabolică are una sau mai multe enzime cheie (*pace - maker*), localizate în apropierea începutului căii, care stabilesc rata progresiei acesteia. Aceste enzime răspund la diferite semnale de control și prin aceasta determină continuarea sau întreruperea căii.

Reglarea enzimelor *pacemaker* (care stabilesc ritmul) are loc la două nivele fundamentale: **1.** activitatea fiecărei enzime, care poate fi direct inhibată sau activată și **2.** sinteza enzimei, respectiv cantitatea acesteia, care poate fi crescută sau scăzută.

1. Controlul direct asupra activității enzimelor.

Inhibiția competitivă. Acest mecanism este exercitat de alte molecule cu o structură similară cu a substratului normal al enzimei și care pot ocupa de aceea același situs activ al enzimei. Deși configurația acestor molecule este adecvată situsului, enzima nu mai poate acționa ulterior. Prin acest mecanism enzima este împiedicată efectiv de a se atașa de substratul ei obișnuit și astfel este blocată activitatea sa, randamentul și posibil restul căii respective. Acest mecanism este comun pentru căile metabolice naturale și reprezintă de asemenea o modalitate importantă de acțiune a unor medicamente utilizate în tratamentul infecțiilor cu agenți patogeni microbieni.

Controlul prin produs final sau *feed-back*. Termenul de *feed-back* este împrumutat din inginerie, unde el este utilizat pentru a descrie un proces în care produsul unui sistem întreține sistemul, controlându-i funcționarea. După cum procesul este stimulat sau inhibat, mecanismul *feed-back* este pozitiv sau negativ. Numeroase reacții enzimatice sunt controlate de un mecanism similar, negativ, în care produsul final fiind reintrodus în sistem anulează (negativează) o activitate enzimatică. La nivele superioare ale substratului și nivele scăzute ale produsului final, enzima lucrează liber, dar pe măsură ce produsul final se acumulează, el stopează acțiunea respectivei enzime (Fig. 36 a). Mecanismele de *feed-back* negativ pot fi cel mai bine înțelese dacă luăm în considerație comportarea alosterică a enzimelor. După cum se știe, proteinele globulare ale enzimelor sunt voluminoase și posedă numeroase trăsături ale suprafeței, o parte a terenului enzimatic (situsul activ) corespunzând substratului. Enzimele alosterice au un situs reglator adițional, pentru atașarea altor molecule în afara substratului. Când o moleculă de produs final are acces la situsul reglator, situsul activ al enzimei este distorsionat, astfel încât nu se mai poate lega de

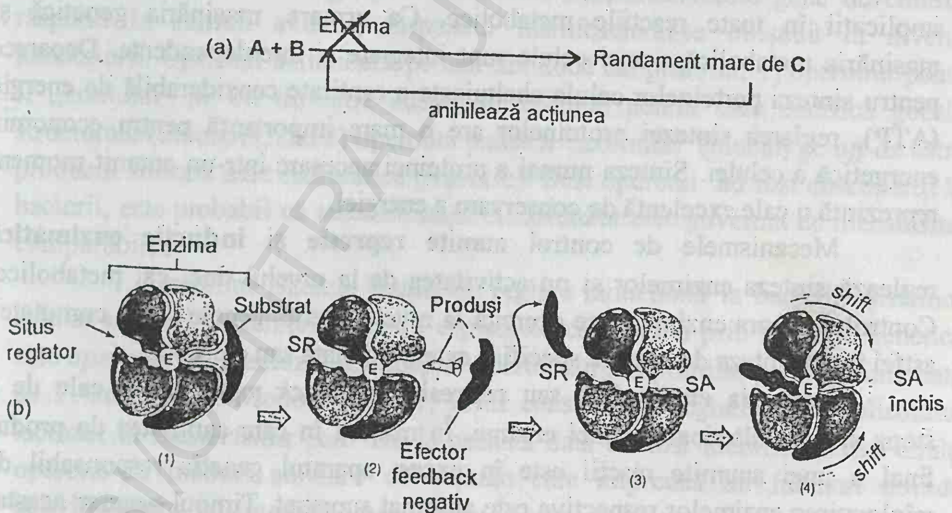


Fig. 36. Controlul enzimatic prin *feed-back* negativ în sistem. (a) Ecuația generală. (b) Comportarea enzimelor alosterice (1,2). Complexul enzimatic în mod normal se atașează substratului la situsul activ și eliberează produși (P). (3) Un produs poate funcționa ca efector feedback negativ prin potrivirea în situsul de reglare al unei enzime (SR). (4) Intrarea produsului în SR determină o modificare (*shift*) conformațională a enzimei care închide SA (situs activ). Un timp enzima nu mai poate cataliza reacții ulterioare cu SA.

substratul său. Deși acest lucru nu denaturează enzima și procesul este reversibil, inhibitorii alosterici pot stopa temporar acțiunea respectivei enzime (Fig. 36 b). Acest mecanism special este numit **inhibiție *feed-back*** și operează prin plasticitatea enzimelor alosterice. În momentul în care produsul final este utilizat la limită și peste necesar, enzima va fi eliberată din inhibiție și-și poate relua funcția catalitică.

2. <u>Controlul sintezei enzimelor: reglarea genetică.</u>

Controlul enzimelor prin reglarea sintezei lor este eficient pentru celulă, deoarece unele enzime se uzează, altele pot fi degradate și altele sunt diluate cu fiecare diviziune celulară. Pentru continuarea catalizei, enzimele trebuie în cele din urmă înlocuite. Reînlocuirea enzimelor poate fi reglată după necesitățile celulei. Mecanismele acestui sistem sunt genetice și necesită reglarea ADN și mașinăriei de sinteză a proteinelor. În această situație mecanismele de reglare a exprimării genelor sunt și mecanisme de reglare a metabolismului celulei bacteriene. Prin transcrierea și traducerea lor, genele cromozomului bacterian direcționează sinteza proteinelor dintre care cele mai multe sunt enzime cu implicații în toate reacțiile metabolice. Ca urmare, mașinăria genetică și mașinăria metabolică a unei celule sunt integrate și interdependente. Deoarece pentru sinteza porteinelor celula cheltuiește o cantitate considerabilă de energie (ATP), reglarea sintezei proteinelor are o mare importanță pentru economia energetică a celulei. Sinteza numai a proteinei necesare într-un anumit moment reprezintă o cale excelentă de conservare a energiei.

Mecanismele de control numite **represie** și **inducție enzimatică** reglează sinteza enzimelor și nu activitatea de la nivelul unei căi metabolice. Controlul asupra enzimelor se exercită la nivel genetic: genele sunt „comutate" astfel încât sinteza de enzime specifice este diminuată sau crescută.

Represia enzimatică sau **represia *feed-back*** reprezintă o cale de a stopa sinteza ulterioară a unei enzime. În măsura în care cantitatea de produs final a unei anumite reacții este în exces, aparatul genetic responsabil de reînlocuirea enzimelor respective este automat supresat. Timpul necesar acestui tip de răspuns este mai îndelungat decât în cazul inhibiției *feed-back*, dar efectele sale sunt de durată mai mare. Un răspuns care se aseamănă inversului inhibiției *feed-back* este **inducția enzimatică**. Prin acest proces formarea enzimelor are loc numai în prezența substratului adecvat, adică sinteza

enzimelor este indusă de substratul corespunzător. Modelul clasic de inducție enzimatică este ilustrat de răspunsul *E. coli* față de prezența în mediu a anumitor zaharuri. De exemplu, dacă o tulpină de *E. coli* este inoculată într-un mediu a cărui principală sursă de carbon este lactoza, tulpina va produce lactază care va hidroliza substratul în glucoză și galactoză. Dacă tulpina bacteriană este inoculată ulterior într-un mediu ce conține zaharoză ca unică sursă de carbon, ea va înceta sinteza lactazei și va începe să sintetizeze enzima necesară hidrolizei zaharozei. Întrucât prin acest tip de răspuns bacteria este capabilă să se adapteze la o varietate de nutrienți, enzimele sunt numite și adaptative. Mecanismul împiedică de asemenea, sinteza unor enzime pentru care nu este prezent substratul și prin urmare nu sunt necesare. Inducția enzimatică este astfel un mecanism care funcționează pe principiul economiei și conservă resursele celulei prin producerea de enzime numai atunci când substratul adecvat este prezent.

Reglarea genetică a sintezei proteinelor și metabolismului se realizează prin intermediul segmentului specific de ADN cromozomal, numit **operon.** Operonii conțin diferite gene de control (reglator, promotor și operator) care condiționează activitatea genelor structurale corelate. Aceste gene de control răspund la stimuli externi, răspunsul manifestându-se obișnuit la nivelul transcrierii. Operonii acționează pe una din două căi posibile: 1) operonul poate fi „comutat" pe *on* de către substratul enzimei pentru care codifică genele structurale (inducție), sau 2) operonul poate fi „comutat" (blocat) pe *off* de către produsul sintezei sale enzimatice (represie). Deși operonii au fost descoperiți la bacterii, este probabil că metabolismul eucariotelor este guvernat de mecanisme comparabile.

1. Operonul lactoză: model de reglare inductibilă la bacterii. Sistemul celular cel mai bine înțeles pentru explicarea controlului prin inducție genetică este *operonul lac* (lactoză). Conceptul operonului *lac* postulat pentru prima dată de F. Jacob și J. Monod în 1961, ia în considerație reglarea metabolismului lactozei la *Escherichia coli*. De la această dată au fost identificați mai mulți operoni cu moduri similare de acțiune care împreună au furnizat dovada convingătoare că mediul unei celule poate avea un mare impact asupra exprimării genelor. Operonul lactoză este format din 3 segmente de ADN: 1) **segmentul reglator** compus din gene care codifică proteina capabilă de represia operonului (**represor**); 2) locusul de control, alcătuit din două gene, **promotorul** (identificat ca palindrom) și **operatorul** unde este inițiată

transcrierea genelor structurale; și 3) locusul **structural**, format din 3 gene, fiecare codificând o enzimă diferită (β-galactozidază; β-galactozid permează și thiogalactozid transacetilază), enzime necasare catabolizării lactozei (Fig. 37). Enzimele operonului sunt de tip inductibil (enzime inductibile).

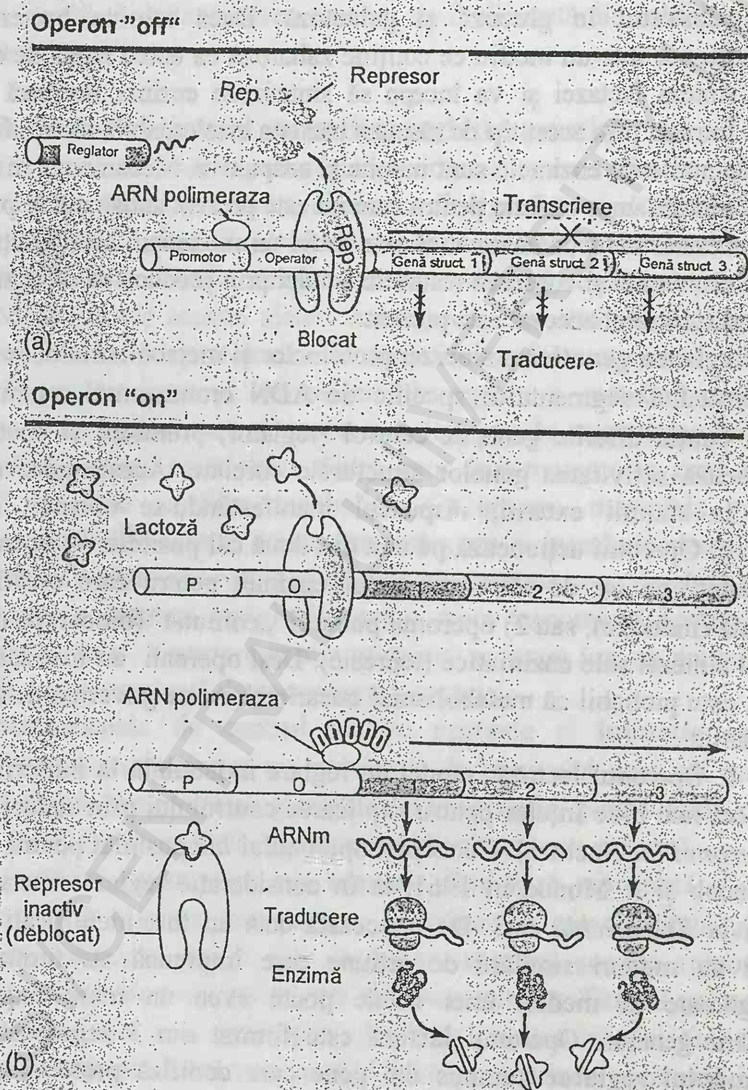


Fig. 37. Operonul lactoză la bacterii: modalitatea prin care gene inductibile sunt controlate de substrat. (a) Operon „off". (b) Operon „on". (Explicații în text).

În sistemele inductibile, cum este operonul lac, operonul se află într-o stare nefuncțională (*off*) și nu inițiază sinteza enzimelor în absența substratului adecvat (Fig. 37 a). Menținerea operonului în această stare este posibilă prin intervenția proteinei represor care este codificată de locusul de reglare (reglator). Această moleculă, relativ mare și pliabilă, are conformații alosterice de legare: una pentru operator și alta pentru lactoză. În absența lactozei, proteina represor se leagă de locusul operator, prin aceasta blocând transcrierea genelor structurale care se află în aval. Ne putem imagina represorul ca un lacăt al operatorului, care dacă închide operatorul, genele structurale nu mai pot fi transcrise.

Prin adăugarea lactozei în mediul celulei, sunt declanșate mai multe evenimente care pun operonul în stare funcțională (*on*). Deoarece lactoza este de fapt responsabilă de stimularea sintezei proteinelor (enzime), ea este numită **inductor**. Legarea preferențială a lactozei de proteina represor instituie o modificare conformațională în represor care are ca efect dislocarea sa de segmentul operator (Fig. 37 b). Segmentul de control, anterior static, este acum eliberat. ARN - polimeraza localizată la situsul promotor este gata să înceapă transcrierea de la situsul operator. Genele structurale sunt transcrise într-un singur transcript, nefragmentat, pentru toate cele 3 enzime și acest ARN_m este tradus de asemenea ca o unitate. După sinteză, enzimele sunt clivate în unități individuale care participă în metabolismul lactozei. Pe măsură ce lactoza este consumată, nemaifiind necesară sinteza ulterioară a enzimelor, ordinea evenimetelor se inversează și operonul revine la starea nefuncțională. Deoarece nu mai este suficientă lactoză pentru a inhiba represorul, acesta este din nou liber să se atașeze de operator. Operatorul este blocat și sunt stopate atât transcrierea genelor structurale, cât și sinteza proteinelor (enzime) corelată cu lactoza din mediu.

2) Operonul represibil. Sistemele bacteriene pentru sinteza de aminoacizi, purină și pirimidină funcționează după principiul represiei. Deși în cazul operonilor represibili există factori similari cu ai celor inductibili, în intervenția acestora pentru reglarea genetică a metabolismului există unele diferențe importante.

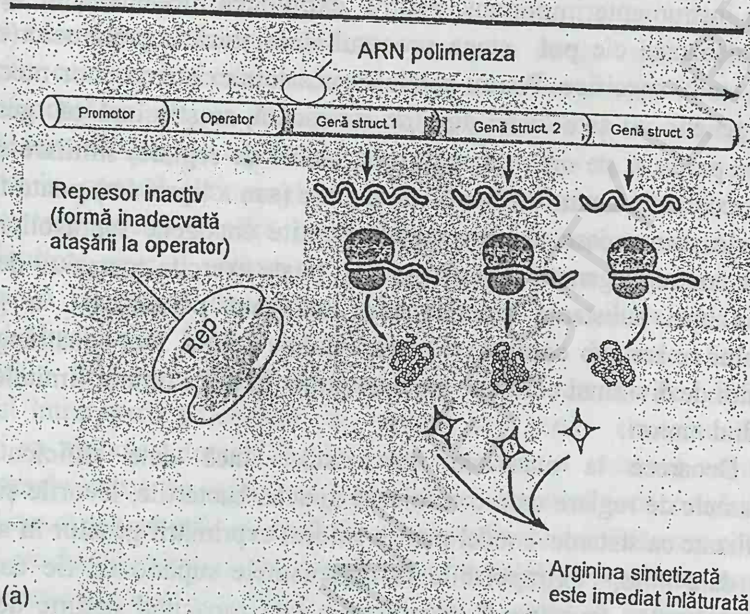
Un operon represibil guvernează anabolismul, sinteza unui nutrient celular important. Spre deosebire de operonul *lac*, operonul represibil se află în mod normal în stare funcțională (*on*) și va fi comutat pe *off* numai atunci când nutrientul respectiv nu mai este necesar. Nutrientul joacă rolul adițional, de

corepresor necesar blocării acțiunii operonului. Modul de funcționare a unui operon represibil, ca mecanism de reglare a metabolismului, poate fi ilustrat pe o celulă bacteriană în curs de creștere care necesită aminoacidul arginină (arg.) In aceste condiții **operonul arg** este în stare funcțională (*on*) și arginina este sintetizată activ prin acțiunea produșilor enzimatici corespunzători (Fig. 38a). Într-o celulă activă , arginina va fi utilizată în cantitatea în care este sintetizată. În acestă situație, represorul va rămâne inactiv, deoarece există prea puțină arginină liberă pentru a-l inactiva . În măsura în care metabolismul celulei începe să scadă în intensitate, arginina sintetizată se va acumula, nemaifiind utilizată la maximum. Acum arginina este liberă să acționeze ca un corepresor prin atașarea de represor. Această reacție produce un represor funcțional, care blochează operatorul și stopează transcrierea ulterioară și sinteza argininei (Fig. 38 b.).

Numeroase gene ale ADN bacterian nu sunt supuse represiei. Asemenea gene conțin informația necesară producerii de enzime, în anumite cantități necesare, indiferent de cantitatea de nutrient existentă in mediu . Enzimele astfel produse sunt numite **enzime constitutive**, după cum genele responsabile de producerea lor sunt gene constitutive. În mod obișnuit aceste gene codifică enzimele pe care celula le necesită întotdeauna în cantități constante pentru procesele vitale majore. De exemplu, enzimele ciclului glicolizei și majoritatea proteinelor represor.

Atât inducția cât și represia enzimatică sunt activități genetice diferențiale, în care sinteza produșilor codificați de genele corespunzătoare este influențată de anumite condiții ambiante. Din acest punct de vedere inducția și represia sunt mecanisme adaptive, cu rol în supraviețuirea organismului.

Exprimarea genelor poate fi influențată însă nu numai de către un nutrient celular care apare în mod natural, ci și de diferite substanțe chimice introduse deliberat în mediul celulei. Asfel cunoașterea mecanismului de reglare a exprimării genelor a condus la aplicații practice privind combaterea bolilor infecțioase provocate de bacterii patogene. Terapia antiinfecțioasă este bazată pe conceptul că anumite antibiotice reacționează (au ca țintă de acțiune) cu ADN, ARN și ribozomi și prin aceasta alterează exprimarea genelor. Tratamentul cu antibiotice se bazează pe premiza că prin blocarea selectivă a mașinăriei sintezei proteice în celula bacteriană, fără afectarea sintezelor celulare ale pacientului, este blocat metabolismul și deci dezvoltarea agentului infecțios



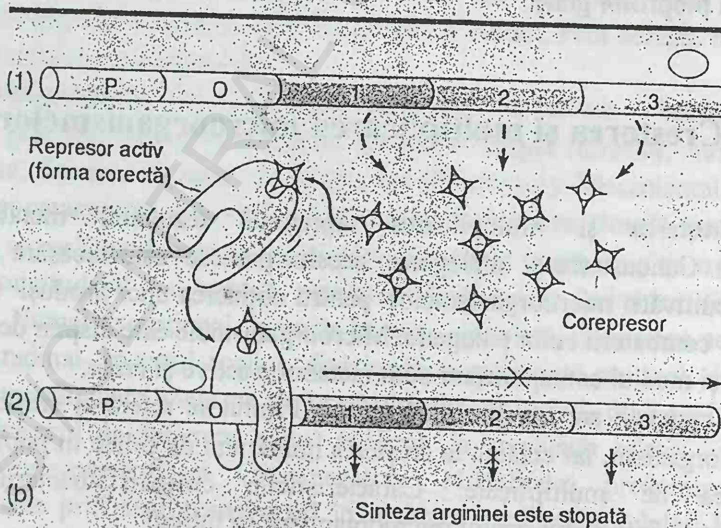


Fig. 38. Operon reversibil: controlul unei gene prin exces de nutrient. (a) Operon „on". (b) Operon „off". (Explicații în text).

microbian. In același timp este interesant de notat că aceste medicamente au servit ca instrumente importante pentru explorarea mecanismelor genetice de reglare, deoarece ele pot stopa procesul de sinteză a proteinelor(enzime) la anumite stadii specifice. Pentru celulele eucariote existența unor mecanisme de control genetic nu este la fel de bine cunoscută, se știe însă că genele pot fi comutate pe *on* și pe *off* prin segmente ADN de reglare, similare operonilor. Dovada existenței anumitor tipuri de reglare (sau a lipsei lor) poate fi detectată în celulele canceroase, în care genele numite oncogene suprasolicită în mod anormal controlul genetic. O oncogenă își poate exercita controlul determinând formarea unei substanțe chimice care activează permanent o porțiune a genomului ce are sub control creșterea celulei. Celula, fără constrângeri asupra numărului de diviziuni celulare, are o evoluție în afara tuturor limitelor normale producând tumori.

Deoarece la eucariote nu există încă date suficiente privind mecanismele de reglare care controlează genele, bacteriile, levurile și virusurile sunt utilizate ca sisteme model pentru studiul exprimării genelor în scopul de a furniza date utile, extrapolabile la organismele superioare. Se consideră că selecția naturală favorizează organismele cu capacități optime de reglare a exprimării propriilor gene.

Creșterea și multiplicarea microorganismelor

Creșterea și multiplicarea reprezintă rezultatul metabolismului microbian. Cunoașterea și înțelegerea acestor procese este necesară în scopul dirijării cultivării microorganismelor pentru obținerea unor produși utili, ca și în scopul combaterii celor patogene. Microorganismele care dispun de nutrienții esențiali și mediul corespunzător sunt metabolic active și cresc.

Creșterea are loc la două nivele. Primul se referă la creșterea unei celule ca organism, iar celălalt la creșterea numărului de celule în populație prin capacitatea de multiplicare. Caracteristicile creșterii bacteriilor sunt reprezentative în general pentru microorganisme ca întreg.

Creșterea este definită în sens biologic drept procesul de mărire coordonată a tuturor constituenților unui organism ca rezultat al producerii sau

adăugării de substanță nouă. Se realizează prin sinteza specifică și echilibrată, pornind de la nutrienții din mediu, a unor compuși de bază (blocuri de construcție) care sunt ulterior asamblați pentru a forma copii fidele ale constituenților celulari. Procesul de creștere este controlat genetic. Creșterea nu trebuie confundată cu mărirea volumului celulei bacteriene prin acumulare de substanțe de rezervă sau prin înglobarea unei cantități mari de lichide (apă). Se consideră că în general forma celulei bacteriene reflectă modul de creștere întrucât creșterea celulei implică o creștere a peretelui celular rigid. Astfel, celulele cilindrice cresc la extremități, iar cele sferice cresc prin depunere de substanță nouă pe cele 3 dimensiuni. Creșterea nu se realizează la infinit, dimensiunile bacteriilor fiind caracteristice în condiții normale. Există un moment critic la care creșterea încetează fiind urmată de diviziune. Mecanismul întreruperii procesului de creștere este puțin cunoscut. Un rol important i se atribuie dezechilibrului între suprafața și volumul celulei. In condiții normale există un raport echilibrat între suprafață (aria celulară prin care se realizează schimburile cu mediul) și volum (masa celulară care consumă nutrienți și produce cataboliți). În timpul creșterii celulei bacteriene, suprafața crește cu o rație pătratică și volumul cu una cubică, astfel că se instalează un anumit dezechilibru ce declanșează procesul de diviziune prin care se restabilește raportul echilibrat între suprafață și volum. Prin această restabilire are loc și multiplicarea bacteriilor.

Multiplicarea sau creșterea numărului de celule bacteriene se realizează prin mai multe mecanisme: diviziune simplă (directă); înmugurire; fragmentare; formare de spori de propagare (dispersare). Mecanismul cel mai răspândit și caracteristic bacteriilor tipice este **diviziunea simplă** sau **binară**. În general se realizează în cazul bacteriilor cilindrice printr-un plan transversal pe axul longitudinal al celulei rezultând două celule indentice (diviziune izomorfă). Numai excepțional, la unele bacterii spiralate, diviziunea se face pe axul longitudinal. In cazul cocilor, diviziunea se realizează pe unul, două, trei planuri perpendiculare unele pe altele rezultând coci izolați, diplococi, tetrade, sarcine. Procesul de diviziune a fost analizat la un număr relativ limitat de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative. Modalitatea predominantă de diviziune este prin **sept transversal** în regiunea mediană a celulei. Secvența evenimentelor procesului de diviziune prin sept transversal implică 3 perioade: (1) **perioada I** (inițiere) care corespunde pregătirii celulei ce se alungește ușor;

(2) **peroiada C** în care are loc replicarea cromozomului bacterian și sinteza proteinelor necesare pentru diviziune; (3) **perioada D** (diviziune propriu-zisă), care începe după migrarea la extremitățile celulei a celor doi cromozomi rezultați prin replicare (Fig. 39). Membrana celulară formează o invaginare (care în unele cazuri capătă o extindere numită mezozom) asociată în cele din urmă cu peretele celular, creindu-se un sept transversal (Fig. 40). În cursul formării, septul transversal înaintează centripet de la periferie spre centru, septul complet fiind mai gros decât peretele periferic. Septul este apoi clivat și în final o celulă mamă formează doua celule surori identice. Celula mamă dispare în urma diviziunii cu prețul obținerii a două celule noi, întinerite.

Diferențele de detaliu care apar în procesele de formare și clivaj a septului crează diferențe caracteristice reflectate în forma și aranjamentul celulelor bacteriene. De exemplu: diplococii sunt formați prin clivaj incomplet al septului; streptococii formează lanțuri lungi prin sinteza de septuri succesive orientate paralel, în timp ce stafilococii formează grămezi tridimensionale prin inițierea fiecărui nou sept, perpendicular pe precedentul.

Ritmul de diviziune este corelat cu replicarea cromozomului bacterian a cărui durată este fixă în condiții normale.

În reglarea procesului de diviziune prin sept transversal intervine un număr mare de gene. Au fost obținute diferite mutante care dezvoltă forme aberante sau produc filamente lungi în situația în care este împiedicată formarea septului transversal. O mutantă interesantă inițiază frecvent formarea septului transversal în apropierea capătului celulei și nu în regiunea mediană, producând așa numitele **minicelule**. Procesul de formare a unei celule (minicelulă) la extremitatea terminală a unei bacterii cilindrice poate fi considerat ca o diviziune asimetrică, aberantă sau heteromorfă. Minicelulele au mai multe particularități caracteristice din care derivă și interesul de ordin practic al utilizării lor. În primul rând se caracterizează prin absența cromozomului și ca urmare incapacitate de creștere și diviziune, rezistență mare la radiații X, γ, U.V.

Minicelulele prezintă fenomene de transport activ prin membrană, au echipament enzimatic propriu, desfășoară un metabolism normal corespunzător și produc ATP. Sunt capabile să primească informație genetică prin conjugare și în cazul în care conțin plasmide, le pot transmite altor celule.

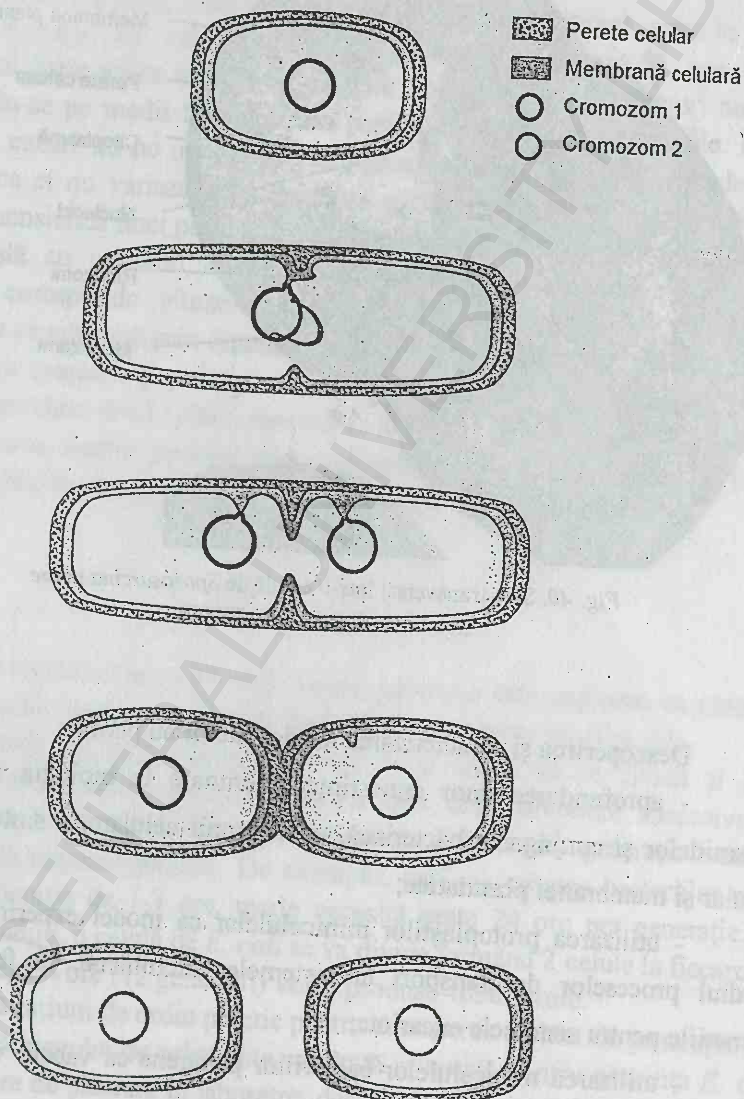


Fig. 39. Etapele diviziunii simple. (Explicații în text).

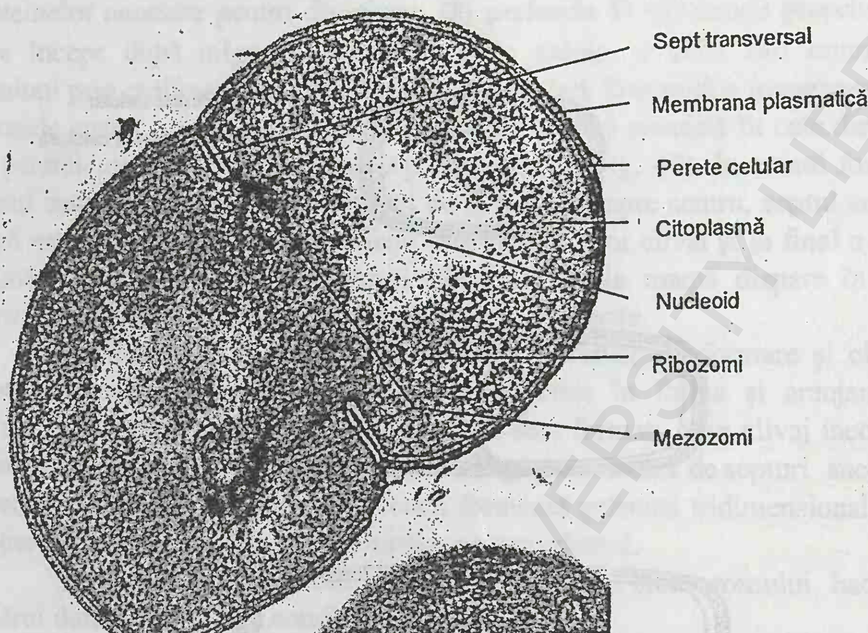


Fig. 40. Sept transversal într-o celulă de *Sporosarcina ureae* în curs de diviziune (x 72000).

Descoperirea și caracterizarea minicelulelor au permis:

- aprofundarea unor cunoștințe referitoare la biologia moleculară a plasmidelor și conjugarea bacteriană, a diviziunii celulare, a sintezei peretelui celular și membranei plasmatice;

- utilizarea protoplaștilor minicelulelor ca model experimental pentru studiul proceselor de transport în sistemele microbiene, la fel de util ca hematiile pentru sistemele eucariote;

- utilizarea minicelulelor bacteriilor patogene ca vaccin viu capabil să confere o imunitate protectivă îndelungată;

- utilizarea în studii genetice a minicelulelor care conțin plasmide, întrucât permit marcarea specifică a produșilor codificați de către gene plasmidiale.

Dinamica procesului de multiplicare a bacteriilor

În mod obișnuit, când ne referim la creștere microbiană avem în vedere de fapt, numărul de celule și nu dimensiunea celulelor. În acest sens, microorganismele aflate în curs de creștere sunt în curs de a-și spori numărul, acumulându-se pe medii favorabile în populații de milioane de celule. În cele mai multe cazuri nu ne interesează creșterea unei celule individuale, deoarece dimensiunea ei nu variază mult în cursul ciclului de viață. Ne interesează de regulă, dimensiunea unei populații bacteriene sau masa totală care este, în mare, proporțională cu numărul de celule bacteriene. Viteza de sporire a masei populației corespunde vitezei de reproducere sau multiplicare. Viteza de multiplicare se măsoară prin durata de generație.

Baza creșterii populației este diviziunea binară. Prin diviziunea unei celule sunt produse două celule, diviziunea a două celule produce patru celule și așa mai departe. Astfel, pornind de la o singură bacterie se ajunge la un număr enorm de celule în **progresie geometrică (creștere exponențială):**

1 2 4 8 16 32 ....

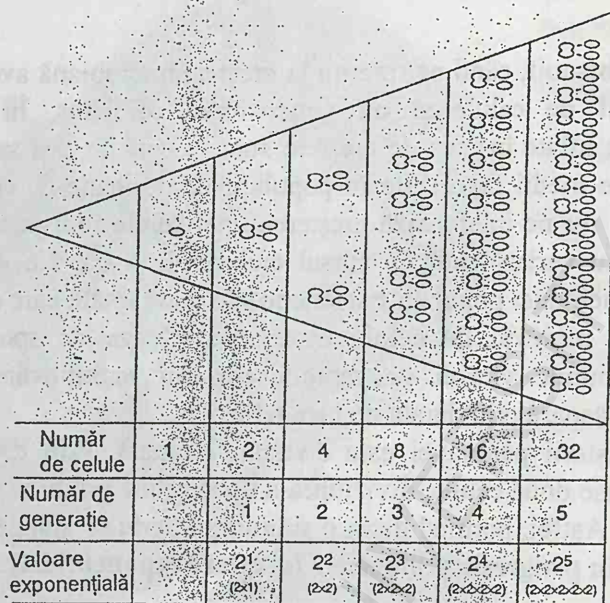
→ → → → →

2^0 2^1 2^2 2^3 2^4 2^5 ....

Dacă numărul de celule din fiecare generație este exprimat ca putere a lui 2, exponentul reprezintă numărul de dublări care a avut loc (Fig. 41).

Perioada de timp necesară pentru ca o celulă să se dividă și deci populația să se dubleze sau timpul scurs între două diviziuni succesive se numește **durată de generație (de dublare)**. Durata de generație variază considerabil la microorganisme. De exemplu, deși majoritatea bacteriilor au o durată de generație de 1-3 ore, unele necesită peste 24 ore per generație. În condiții favorabile, o celulă de *E. coli* se va divide formând 2 celule la fiecare 20 de minute. După 4 ore (12 generații) vor fi produse 4096 celule.

Există rațiuni de ordin practic pentru cunoașterea duratei de generație. De exemplu, dacă o probă de urină este recoltată și testată pentru prezența *E. coli* după câteva ore de păstrare în laborator, deși inițial proba conținea câteva celule (cum ar fi normal), în decursul timpului dintre recoltare și testare, *E. coli* se poate reproduce într-o asemenea măsură, încât rezultatul testului indică o infecție serioasă.



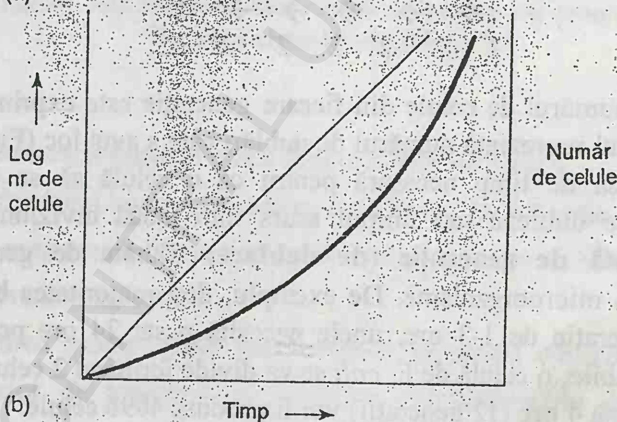


Fig. 41. Transpunerea matematică a creșterii populației. (a) Pornindu-se de la o singură celulă, dacă fiecare produs al reproducerii continuă să se dividă într-o manieră binară, populația se dublează cu fiecare nou ciclu de diviziune sau generație. Acest produs poate fi reprezentat prin numere simple sau logaritmi. (b) Reprezentarea grafică a numărului de celule (aritmetic) corespunde unei curbe înclinate, în timp ce reprezentarea logaritmului de celule produce o linie dreaptă indicând creșterea exponențială.

Cunoscând durata de generație și condițiile necesare creșterii microbiene, putem prevedea cât de repede vor crește microorganismele în diferite situații și putem determina modalitatea de control a acestei creșteri. Populațiile microbiene pot deveni foarte mari într-un timp foarte scurt și creșterea microbiană necontrolată poate determina boli grave și alterări ale alimentelor.

Predicția numărului de celule care se formează în cursul unei lungi perioade de creștere (ce produce milioane de celule) se bazează pe un concept relativ simplu. Se poate utiliza metoda adunării: 2+2 = 4 + 4 = 8 + 8 = 16 + 16 = 32, etc. sau metoda multiplicării (de ex. $2^5 = 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2$), dar se poate constata că pentru 20 sau 30 de generații acest calcul devine dificil. Pentru a calcula mărimea unei populații în timp este recomandată utilizarea ecuației: $N_f = (N_i)2^n$ în care, N_f = numărul total de celule în populație într-un moment al fazei de creștere; N_i = numărul de la care se pornește (start); 2^n = numărul de generații. Dacă se cunosc două din (oricare) aceste valori, cealaltă poate fi calculată.

În condiții artificiale, pe medii de cultură, multiplicarea bacteriilor are loc după o dinamică ce poate fi analizată prin obținerea așa numitei curbe de creștere.

Curba de creștere a bacteriilor reprezintă evoluția unei populații într-o cultură discontinuă, asincronă.

Procedeele de cultivare a microorganismelor sunt mult studiate ca desfășurare și factori care influențează procesul, datorită semnificației acestora în domenii practice. Prin asemenea procedee pot fi obținute în principal două tipuri de culturi: 1) culturi discontinue, asincrone (cu alternativa culturilor sincrone, necesare în anumite situații); 2) culturi continue.

1) Culturile discontinue, asincrone corespund modalității de cultivare în sistem închis (diferite flacoane sau eprubete) cu sensul că procedeul de cultivare are loc în volum fix de mediu nutritiv de la începutul până la sfârșitul experimentului. Pe lângă volumul de mediu fix (nereînnoit) pe tot parcursul cercetării, cultivarea discontinuă și asincronă are anumite particularități:

- compoziția chimică a mediului se modifică în cursul studiului, sub raportul conținutului în nutrienți, a valorii pH, precum și a produșilor rezultați în metabolism (acumulare de cataboliți, între care unii toxici);
- numărul bacteriilor viabile este variabil (crește progresiv și ulterior începe să scadă prin îmbătrânire și moarte);
- ritmul de diviziune este inegal: mai mare la început, când populația este tânără și mediul optim, pentru ca apoi să scadă progresiv. Există și diferențe

individuale care definesc culturile ca asincrone. Chiar atunci când cultura este pornită de la o singură celulă bacteriană, primele celule se divid sincron, pentru ca apoi să apară fenomenul de desincronizare;

- vârsta celulelor este diferită;

- numărul de generații este limitat datorită limitării procesului de multiplicare de către anumite condiții de mediu.

Deși prezintă dezavantaje, metoda de cultivare în sisteme închise satisface cerințele obișnuite, practice și este utilizată în mod curent în laborator. Pentru atenuarea unor dezavantaje ale metodei în care creșterea este asincronă, se recurge la culturile sincrone. Ele sunt obținute prin artificii de tehnică prin care se reglează ritmul de diviziune al bacteriilor , astfel încât majoritatea sau chiar toate bacteriile se divid în același timp.

2) Culturile continue sunt obținute în condiții speciale utilizându-se diferite sisteme (în principal de tipul chemostatului sau turbidostatului) în care mediul de cultură este reînnoit permanent printr-un mecanism dublu: se adaugă cu un anumit ritm mediu proaspăt și cu același ritm se recoltează din cultura microbiană multiplicată. Acest tip de culturi furnizează celule cu proprietăți uniforme și activități fiziologice optime, fiind utilizate în procese biotehnologice, industriale. Atât culturile continue cât și cele sincrone, necesită condiții deosebite, dificil de realizat, în timp ce culturile discontinue asincrone pot fi obținute în condiții obișnuite de laborator.

Prin inocularea câtorva celule bacteriene într-un mediu de cultură lichid și efectuarea de numărători ale populației obținute la intervale de timp, este posibilă trasarea unei curbe de creștere tipice pentru bacterii care denotă creșterea bacteriilor în timp.

Calea cea mai simplă de reprezentare grafică a evoluției populației bacteriene este utilizarea unei scale logaritmice și nu aritmetice (Fig. 41). Notăm că dacă mărimea unei populații microbiene care sporește exponențial este reprezentată logaritmic, creșterea formează o linie dreaptă. Declinul și moartea unei populații microbiene pot fi trasate în același mod. Evoluția unei populații într-o cultură discontinuă asincronă corespunde astfel unei curbe de creștere reprezentată grafic în funcție de timp și logaritmul numărului de celule. Există 4 faze principale de creștere, evidențiate pe curbă (Fig. 42).

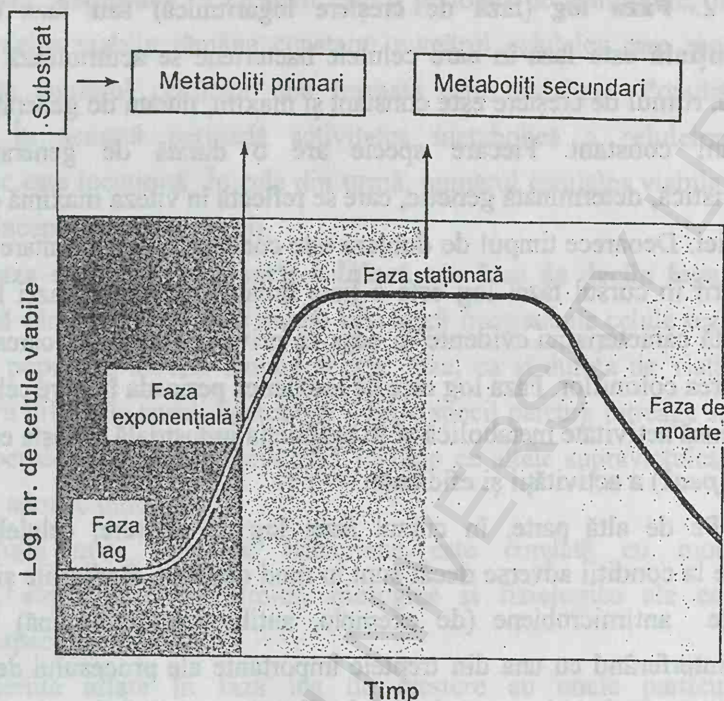


Fig. 42. Curba de creștere bacteriană cu cele 4 faze tipice de creștere și marcarea originii metaboliților primari și secundari recoltați prin procese industriale.

1) **Fază de lag** (de la engl. <to lag> = a întârzia) sau **de creștere 0**. Din momentul inițierii culturii prin introducerea unui inocul în mediul nutritiv urmează un răstimp în care numărul celulelor bacteriene însămânțate rămâne neschimbat sau se modifică foarte puțin. Această perioadă este numită faza de lag și poate avea o durată variabilă, în funcție de anumiți factori. În cursul ei celulele nu sunt latente ci au o activitate metabolică intensă (în special sinteză de enzime), pregătindu-se pentru procesul de multiplicare. La sfârșitul acestei faze celulele bacteriene încep să crească (unele își pot dubla sau tripla dimensiunea), să se dividă cu un ritm progresiv crescând, realizând tranziția, prin această etapă de ințiere a creșterii sau accelerare a ritmului de creștere, către faza a două a curbei de de creștere.

2. **Faza log** (faza de creștere logaritmică) sau faza **de creștere exponențială** este faza în care celulele bacteriene se acumulează cu o viteză maximă, ritmul de creștere este constant și maxim, durata de generație atinge un minimum constant. Fiecare specie are o durată de generație minimă caracteristică, determinată genetic, care se reflectă în viteza maximă de dublare a populației. Deoarece timpul de dublare este constant, o reprezentare logaritmică a creșterii în cursul fazei log este o linie dreaptă. În cursul fazei log, celulele manifestă caracteristici evidente în ceea ce privește forma, culoarea, densitatea și gruparea coloniilor. Faza log este de asemenea perioada în care celulele au cea mai intensă activitate metabolică și în producția industrială aceasta este perioada de vârf (*peak*) a activității și eficienței.

Pe de altă parte, în cursul fazei log de creștere, celulele sunt mai sensibile la condiții adverse decât sunt în mod obișnuit. Radiațiile și numeroase substanțe antimicrobiene (de exemplu, antibioticul penicilină) își exercită efectul interferând cu una din treptele importante ale procesului de creștere și sunt de aceea mai nocive pentru celulele aflate în această fază.

Capacitatea exponențială de creștere durează însă o perioadă de timp limitată, datorită condițiilor limitante care apar în mediul de cultură sau în natură. Teoretic, dacă bacteriile s-ar înmulți exponențial nelimitat, în decurs de 20 - 22 - 24 ore (funcție de specie) ar realiza o masă (în g) care ar depăși greutatea planetei. În condiții de laborator factorii nutriționali în primul rând fac ca numărul celulelor bacteriene pe unitatea de măsură să fie limitat. Astfel numărul celulelor bacteriilor aerobe, cultivate staționar ajunge la maxim 2×10^8/ ml mediu, iar în condiții de agitare crește până la 5×10^9 / ml mediu.

Pe curba de creștere, la sfârșitul fazei de creștere exponențială, se evidențiază o perioadă de încetinire a ritmului de creștere care precede faza staționară. Numai în culturile continue, este posibilă menținerea unei populații în faza exponențială de creștere, indefinit.

3. **Faza staționară** a creșterii este o perioadă de echilibrare, în care numărul celulelor viabile rămâne constant: numărul celulelor care mor este compensat de numărul celulelor nou formate prin diviziune. Populația se stabilizează. În această perioadă activitatea metabolică a celulelor care supraviețuiesc este încetinită. În cele din urmă, numărul celulelor viabile scade progresiv și începe declinul culturii.

4. **Faza de declin și moarte celulară** sau **faza de declin logaritmic** continuă până când populația este redusă la o mică fracțiune de celule rezistente sau întreaga populație moare. Durata acestei faze, ca și durata de viață, sunt diferite pentru diferitele specii bacteriene. Unele specii parcurg întreaga serie de faze ale curbei de creștere în câteva zile, în timp ce altele supraviețuiesc, prin unele celule, apoape indefinit.

Evoluția unei populații bacteriene este corelată cu modificări morfologice, structurale, biochimice, biologice și fiziologice ale celulelor bacteriene respective.

Bacteriile aflate în faza log de creștere au unele particularități importante: au o mărime uniformă, mai mare decât cea normală; o citoplasmă omogenă cu un conținut mare de ARN și o bazofilie marcată; nu conțin materiale de rezervă. Sunt celulele tinere, în care activitățile metabolice și biologice sunt maxime, celule potrivite pentru experimente și pentru a fi utilizate ca inocul.

Celulele din faza staționară sunt celule bacteriene mature, cu morfologie normală, tipică și dimensiuni caracteristice pentru specie. Se colorează normal și obișnuit se diferențiază caracteristic în Gram-pozitive și Gram-negative. Spre sfârșitul fazei apar, intracelular, primele granulații și primii spori.

Celulele din faza de declin se caracterizează printr-o morfologie alterată, cantități mari de substanțe de rezervă, afinitate pentru coloranții acizi. În cazul bacteriilor sporogene, în populație predomină sporii.

În corelație cu aceste modificări, cunoașterea evoluției populației microbiene (curbei de creștere) are o deosebită importanță pentru stabilirea perioadelor de recoltare prin procese industriale a metaboliților primari și secundari. Producerea metaboliților primari care sunt esențiali pentru funcția microorganismelor are loc în cursul căilor metabolice majore. Ei sunt, în general, compuși de tipul aminoacizilor și acizilor organici, sintetizați în cursul fazei log de creștere. Sinteza metaboliților secundari: antibiotice, steroizi, care sunt neesențiali pentru creșterea microorganismelor, are loc în faza staționară. (Fig. 42). Majoritatea microorganismelor utilizate în industrie au fost selecționate după capacitatea înaltă de producere a unui metabolit primar sau secundar.

VIRUSURI

Definiție și particularități generale

Virusurile sunt entități infecțioase acelulare, reprezentate de complexe macromoleculare potențial alcătuite din subunități moleculare repetitive.

Termenul de **virus** (latinizat din cuvântul grecesc cu semnificație de otravă de natură biologică, venin de șarpe) a fost mult timp utilizat ca sinonim cu agent infecțios, fiind ulterior restrâns la o categorie aparte de agenți infecțioși definiți prin anumite particularități, pe măsură ce acestea au fost descoperite. Inițial, odată cu descoperirea lor, virusurile au fost definite ca agenți filtrabili, capabili de a trece prin filtre care rețineau, după dimensiunile lor, toate bacteriile, fungii și protozoarele cunoscute. Caracterizate astfel ca grup distinct de agenți infecțioși numai după dimensiunile lor și prin acțiunea asupra organismelor vii (incapabile fiind de multiplicare în afara unei gazde vii), virusurile s-au dovedit a dispune de un mecanism propriu de reproducere și o compoziție chimică distinctivă.

Odată cu progresele realizate în domeniile microscopiei electronice și procedeelor analitice au fost realizate descoperiri surprinzătoare privind structura și comportamentul virusurilor. Ele sunt parazite în toate tipurile de celule, putând provoca boli omului, animalelor și plantelor. Ele pot infecta de asemenea bacteriile, fungii și protistele.

Virusurile sunt în prezent definite în termenii structurilor lor caracteristice și a modului propriu de replicare: disocierea în componente după pătrunderea într-o celulă gazdă, utilizarea mașinăriei gazdei pentru sinteza componentelor codificate de genele virale și formarea de noi unități prin reasamblare.

Atât ca structură, cât și ca ciclu de existență, virusurile diferă fundamental de microorganisme.

O contribuție majoră la definirea virusurilor, prin stabilirea unui cadru conceptual care să permită norme de caracterizare comparativă a virusurilor cu celulele bacteriene, a adus-o A. LWOFF (între anii 1953 - 1981), care de altfel, a pus cel dintâi această problemă în mod științific. Astfel, luând ca model de organizare celula bacteriană vie pot fi stabilite o serie de caractere discriminatorii ale virusurilor care conduc și la concluzii privind natura lor.

Aceste caractere pentru virusuri se referă la:

◆ Tipul de organizare: acelular.

◆Unitatea de structură și funcție: **virion** sau **particula virală matură** (completă din punct de vedere morfologic).

◆ Stările posibile de existență: a) **virionul**, particula virală matură în forma în care este eliminată din celula în care s-a replicat; b) **virusul vegetativ**, genomul viral liber în celulă, pregătit pentru inițierea procesului de replicare; c) **provirus**, genomul viral integrat în genomul celulei gazdă.

◆ Modelul general de structură, raportat la virion, este reprezentat de: a) ***constituenți esențiali*: genom viral** și **învelișul proteic** al acestuia (numit și **capsidă**) și b) ***constituenți accesorii:* învelișul viral extern** sau **anvelopa** (numită și peplos) și **spiculele** sau glicoproteinele, implantate în învelișul extern.

◆ Simetria la nivel molecular, o trăsătură unică prezentă la nivelul capsidei (gr. <capsa> = cutie) virusurilor și care este o necesitate absolută, derivând din faptul că virionul are o capsidă formată dintr-un număr fix de proteine.

◆ Compoziția chimică limitată la acizi nucleici (ADN sau ARN); proteine, dintre care majoritatea structurale și numai câteva enzimatice și, în unele cazuri, lipide și glicoproteine de proveniență (totală și respectiv parțială) din celula gazdă în care a avut loc replicarea. Se remarcă absența echipamentului enzimatic de biosinteză și catabolizare, ceea ce explică absența capacității de sinteză independentă de constituenți proprii și deci, a capacității de creștere. Tabelul 6 prezintă sintetic anumite particularități ale virusurilor în comparație cu celulele.

Tabelul nr. 6

Compararea virusurilor cu celulele

Proprietatea	Virusuri	Celule
Tipul de acid nucleic	ADN sau ARN, dar nu ambele	ADN și ARN
Proteine	Câteva	Numeroase
Membrana lipoproteică	Anvelopă prezentă la unele virusuri	Membrană celulară prezentă la toate celulele
Ribozomi	Absenți	Prezenți
Mitocondrii	Absente	Prezente la celulele eucariote
Enzime	Niciuna sau câteva	Numeroase
Multiplicare prin diviziune	Nu	Da (majoritatea celulelor)

◆ Multiplicarea realizată prin replicare (copiere) are loc obligatoriu într-o celulă vie pornind în exculsivitate de la genomul viral.

Într-o celulă normală care se dezvoltă în baza unei ordini biologice proprii, infecția virală aduce o informație nouă, informația genetică virală. Cele două informații pot coexista în mod normal numai în situații speciale: starea de provirus, situație în care informația genetică virală integrată în structura cromozomului se comportă similar unor gene normale. În mod obișnuit nu pot exista cele două tipuri de informație genetică, ci informația genetică virală fie este eliminată, fie perturbă celula gazdă astfel încât aceasta face sinteză de virus. Această relație este foarte subtil controlată pentru că dacă virusul omoară celula gazdă nu mai are loc replicarea lui.

În celula gazdă infectată de virus există o fază de sinteză, care depinde exclusiv de celula gazdă cu condiția ca acțiunea virusului să nu fie foarte brutală și o fază de diataxie, dominată de informația genetică virală, fiind deviată în sensul producerii (replicării) de virus. Rezultă astfel o proprietate unică în natură, caracteristică numai virusurilor și denumită de Lwoff **parazitism absolut**.

Faptul că virusurile folosesc mașinăria metabolică a celulei gazdă ridică dificultăți în obținerea medicamentelor antivirale întrucât majoritatea medicamentelor care interferă cu multiplicarea virală, interferă de asemenea cu funcționarea celulei gazdă, fiind toxice pentru utilizare clinică.

Particularitățile definitorii ale virusurilor dictează și natura acestor entități infecțioase.

Natura și originea virusurilor

Definiția dată în 1959 de către A. Lwoff - laureat al Premiului Nobel - : „Un virus este un virus" reflectă un adevăr evident: unicitatea virusurilor în lumea vie.

După ce Stanley, în 1935, a obținut VMT în stare cristalizată au urmat dezbateri aprinse asupra naturii virusului: este viu sau în esență o moleculă de nucleoproteină. Aceste discuții au reflectat punctele de vedere diferite (teleologic, operațional) ale oamenilor de știință asupra înțelesului noțiunii de viu sau viață. Viața poate fi considerată ca un set complex de procese care rezultă din punerea în acțiune a instrucțiunilor codificate la nivelul genelor (acidului nucleic). Acizii nucleici ai celulelor vii sunt tot timpul în acțiune. Genele virale sunt „însuflețite" după ce acidul nucleic viral a pătruns într-o celulă sensibilă. În afara celulelor, virionii sunt substanțe chimice matabolic inerte și deci neanimate.

Din punct de vedere clinic virusurile pot fi considerate agenți patogeni „vii", pentru că ele produc infecția și boala la fel ca bacteriile, fungii și protozoarele patogene.

Admițând celula bacteriană „ca minimum necesar care caracterizează viața", virusurile nu sunt organisme în sens uzual. Virusurile sunt paraziți genetici pentru că nu își pot realiza întregul ciclu de infecție până când acidul lor nucleic nu ajunge în interiorul celulei gazdă. Ele sunt genomuri parazite, înrudite cu plasmidele. În plus, unele genomuri virale, ca și anumite plasmide, pot fi integrate în ADN din celula gazdă exercitând aceeași formă de parazitism cu cea manifestată de elementele ADN mobile și de anumite secvențe repetate abundente în ADN din celulele eucariote.

Un virus reprezintă în esență un program genetic, purtător de la o celulă la alta al simplului mesaj : „reproduce-mă". Astfel, un virus poate fi definit ca un element genetic, constituit fie din ADN fie din ARN, care este replicat în celulă, dar este caracterizat ca având o formă extracelulară. Ca elemente genetice, virusurile controlează propria replicare și transferul de la o celulă la alta.

În ceea ce privește originea virusurilor există două ipoteze. Oamenii de știință consideră în general că virusurile în forma lor actuală trebuie să fi apărut după apariția celulelor, datorită dependenței lor de sistemele replicative furnizate de propriile gazde.

Progresele remarcabile ale virologiei au dus la recunoașterea faptului că foarte multe virusuri, identificate în ultimul timp, au efecte întârziate sau nu au nici un efect aparent asupra gazdei. La această remarcă se adaugă constatarea posibilității de integrare a virusurilor în cromozomul gazdei și a capturării de gene ale gazdei. Aceste rezultate sugerează o primă ipoteză: originea virusurilor din cromozomi celulari și manifestarea lor primară ca agenți de transmitere a blocurilor de material genetic dintr-un organism în altul și nu ca paraziți. Este posibil astfel ca virusurile să descindă din porțiuni ale programelor genetice ale gazdei, care recurg la cunoașterea intimă a celulei (de proveniență) în scopul propriei duplicări.

O a două ipoteză ia în considerație posibilitatea ca virusurile să reprezinte celule degenerate care și-au pierdut treptat, în cursul multor generații, capacitatea de a supraviețui independent ci numai prin asociere cu o altă celulă.

Oricum, virusurile reprezintă modele utile pentru studiul organizării moleculelor în unități auto-perpetuante la începuturile vieții. Ele indică modul în care poate fi generată și procesată informația la nivel molecular. Esența informației lor genetice este autoconservarea, pe care o realizează prin mutageneză, reproducere și adaptare la un mediu aflat constant în modificare.

Luând în considerare poziția lor specială în spectrul biologic este cel mai bine să ne referim la virusuri ca particule infecțioase (și nu organisme) și ca active sau inactive (și nu ca vii sau neanimate).

Structura generală a virusurilor

Forma și dimensiunile

Arhitectura virală poate fi cel mai bine observată prin utilizarea combinată a unor colorații speciale și a microscopului electronic. Colorațiile negative utilizează straturi foarte subțiri ale unei săruri opace pentru a sublinia forma virusurilor în contrast cu fondul întunecat și pentru a amplifica trăsăturile

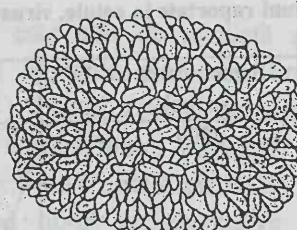
privind textura suprafeței virale. Colorațiile așa numite pozitive ale unor porțiuni specifice ale virusurilor (proteine, acidul nucleic) relevă detalii de interior. În procedeele de umbrire, preparatul este atașat de o suprafață și inundat cu vapori metalici denși, direcționați sub un anumit unghi. Învelișul metalic fin de pe suprafața virusului aproximează contururile sale și pe partea neexpusă este lăsată o umbră.

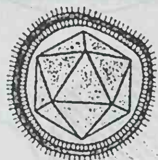
Forma virusurilor este menționată frecvent în termeni obișnuiți, ca de exemplu: sferă, bastonaș, glonte, cărămidă, spermatozoid sau cireașă cu coadă. În realitate este vorba de structuri complexe cu o simetrie geometrică precisă. Forma particulelor virale este determinată de aranjamentul subunităților repetitive care formează învelișul proteic sau capsida virusului. Capsida include genomul și dă virionului forma caracteristică. Forma și dimensiunea unor tipuri de virusuri sunt reprezentate în Fig. 43.

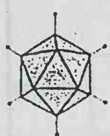
Dimensiunile virusurilor sunt apreciate prin filtrare (utilizând filtre cu diametrul porilor cunoscut) și prin ultracentrifugare. Ca grup, virusurile (cu unele excepții) reprezintă agenții infecțioși cu cele mai mici dimensiuni, intrând în domeniul ultramicroscopic. Aceasta înseamnă că majoritatea au dimensiunea $< 0,2$ µm, astfel încât pentru detectarea sau examinarea structurii lor este necesar microscopul electronic.

Compararea cu dimensiunile celulelor gazdă este sugestivă: de exemplu peste 2000 virusuri ale bacteriilor (bacteriofagi) corespund unei singure celule și peste 50000000 poliovirusuri ar corespunde unei celule umane de dimensiuni medii (Tabel . 7).

Dimensiunea virusurilor animalelor variază de la parvovirusuri (virusuri ADN nude care determină infecții intestinale) - cele mai mici (~20 nm) - la poxvirusuri (un grup care include virusul variolei ce determină umflături caracteristice ale pielii numite „pox") care sunt la fel de mari ca bacteriile mici (până la 450 nm lungime). Unele virusuri cilindrice sunt relativ lungi (800 nm lungime) dar au diametrul atât de mic încât nu pot fi evidențiate decât la microscopul electronic. Diametrul virusurilor, cuprins între 20 și 300 nm corespunde în mare unui spectru de dimensiuni care se întinde de la cea mai mare moleculă de proteină până la cea mai mică celulă.



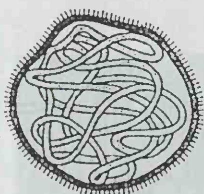


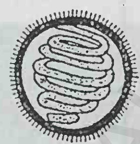


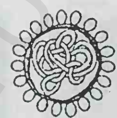


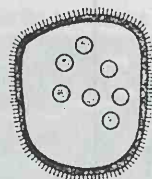


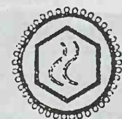
Virusuri ADN





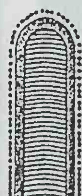




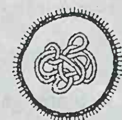












100 nm

Virusuri ARN

Fig. 43. Forma şi dimensiunea unor virusuri cu importanţă medicală.

Tabelul nr. 7

Dimensiuni raportate la celule, virusuri și molecule.

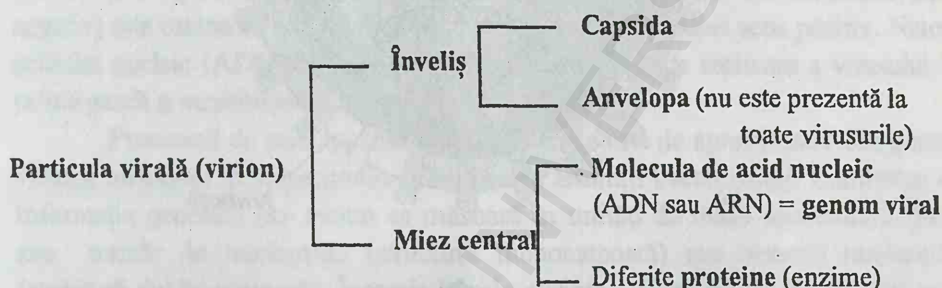
Tip	Diametrul mare (în nm)	
Hematii	7500	
Bacterii		
Streptococcus	750	
Rickettsia	250	
Virusuri		
V. vaccina	210	
V. herpes simplex	130	
V. rabiei	125	
V. influenza	85	
Adenovirus	75	
Bacteriofag T2	65	
V. poliomielitei	27	
V. febrei galbene	22	
V.M.T.	15 (dar 300 în lungime)	
Molecule		
Hemoglobină	15	
Ovalbumină	10	

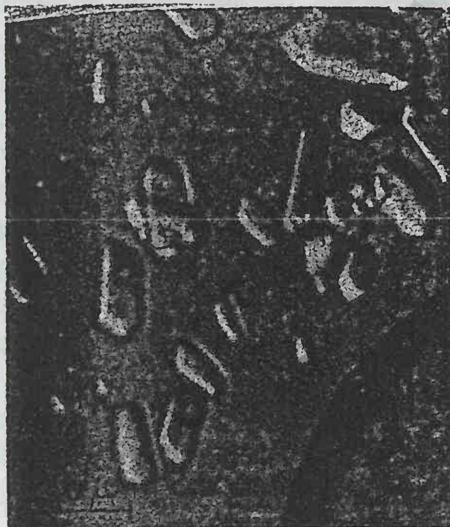
Constituenții virali

Structura virusurilor este atât de regulată și cristalină încât multe virusuri purificate formează agregate mari sau cristale dacă sunt supuse anumitor tratamente (Fig. 44). Planul general de organizare a unui virus este remarcabil prin simplitate și compactitate. Virusurile conțin numai acele părți necesare pentru a invada și controla o celulă gazdă: un înveliș și un miez central.

Anatomia celor două tipuri reprezentative de particule virale este prezentată în Fig. 45.

Modelul de organizare poate fi prezentat după cum urmează:





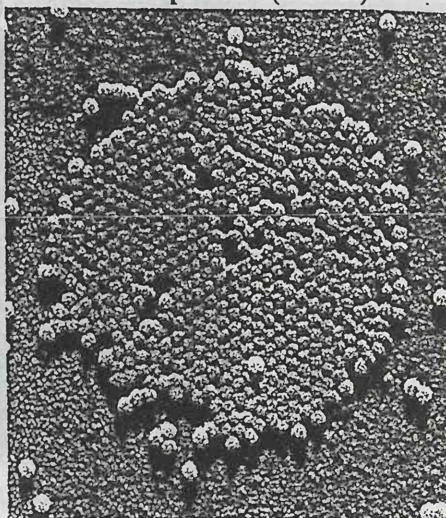
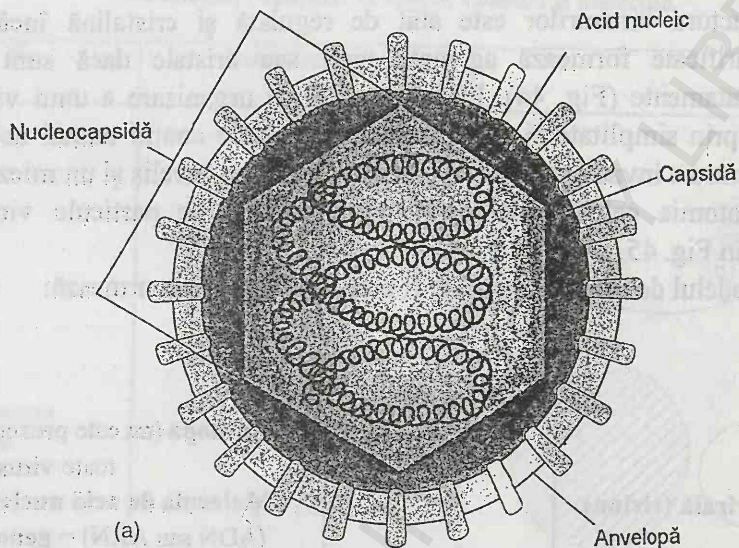


Fig. 44. Natura cristalină a virusurilor. (a) Cristale de particule de poliovirus purificat (x 1200). (b) Microelectronografia (x 150.000) capsidelor aceluiași virus evidențiind natura lor geometrică.



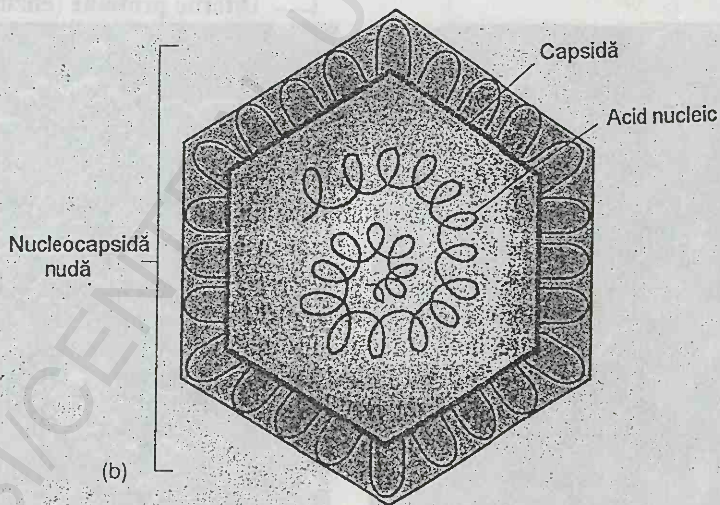


Fig. 45. Structura generalizată a virusurilor, pe cele două tipuri de bază de particule virale: (a) virus anvelopat și (b) virus nud.

Acizii nucleici virali

Acidul nucleic sau genomul viral este localizat în interiorul particulei virale și poate fi ADN mono- sau dublucatenar (la virusurile ADN sau dezoxiribovirusuri) sau ARN mono- sau dublucatenar (la virusurile ARN sau ribovirusuri). Numai virusurile au material genetic compus din ADNmc sau ARNmc sau dc. ARN monocatenar aparține la două clase, notate respectiv cu + în cazul în care pătrunzând în celula gazdă poate acționa direct ca ARNm pentru sinteza proteinelor și cu - pentru catena care nu are proprietate de mesager și trebuie transcrisă în ARNm. Altfel spus, catena plus (catenă mesaj = sens +) este catena care conține triplete de codificare ce pot fi traduse de ribozomi. Catena minus (sens negativ) este catena cu secvențe de baze complementare catenei sens pozitiv. Natura acidului nucleic (ADN sau ARN) condiționează modul de replicare a virusului în celula gazdă și sensibilitatea la agenți antivirali.

Procentul de acid nucleic față de proteine este de aproximativ 1% pentru virusul influenza și aproximativ 50% pentru anumiți bacteriofagi. Cantitatea de informație genetică per virion se măsoară în unități de masă moleculară (Da.) sau număr de nucleotide (structură monocatenară) sau perechi nucleotide (structură dublu catenară). Întrucât bazele purinice și/sau pirimidinice sunt cele care caracterizează structura nucleotidelor, unitatea de măsură devine baza din nucleotid (sau perechile de baze). Acizii nucleici fiind macromolecule cu mii de baze, unitatea de măsură frecventă este kb., care reprezintă o mie de perechi nucleotidice pentru structură dublu catenară sau o mie de nucleotide pentru structură monocatenară. 1 kb. (1000 baze) corespunde la o masă moleculară de aproximativ 700.000 Da. pentru acidul nucleic dublu catenar și 350.000 Da. pentru acidul nucleic monocatenar; ea poate specifica aproximativ 33.000 Da. de proteină. Studiul raportului între mărimea genomului viral și mărimea capsidei (proteinelor structurale) a dus la elucidarea simetriei virale.

Cantitatea de informație genetică / virion variază de la 3 - 300 kb., iar numărul genelor este aproximativ egal cu numărul de kb. Deci, dacă 1 kb. este considerată ca mărimea unei gene medii, virusurile mici conțin probabil 3 sau 4 gene și cele mari câteva sute (față de bacteria *Escherichia coli* care are ~ 4000 gene și o celulă umană care are ~ 100000 gene). Diversitatea proteinelor specificate de genomul viral și sintetizate în celula infectată variază în mod corespunzător.

Cu excepția retrovirusurilor care au virioni diploizi, virusurile conțin numai o singură copie a genomului, fiind deci haploide.

Genomul viral poate avea forme diferite (liniară, circulară. superhelix, extremități adezive sau nu, etc) și structuri diferite (moleculă unică sau segmentată, cu segmente izolate sau legate cap la cap prin legături necovalente). În formă extinsă, liniară sau circulară, nu poate fi inclus în capsidă, ci numai împachetat.

Genomul ADN al virusurilor (dezoxiribovirusuri) prezintă mai multe tipuri principale de structuri (Fig. 46), dintre care menționăm:

- genom monocatenar liniar - întâlnit la unele parvovirusuri;
- genom monocatenar circular care poate fi de aceeași polaritate la toți virionii sau de ambele polarități dar la virioni diferiți;
- genom dublu catenar liniar cu secvențe terminale repetate - adenovirusuri;
- genom dublu catenar circular închis covalent care duce la forma de moleculă superrăsucită - virusurile polyoma și SV40;
- genom dublu catenar circular închis necovalent prin extremități adezive complementare (bacteriofagul lambda).

Virusurile cu genom ARN (ribovirusuri) cuprind mai multe tipuri de structură din care, interesant pentru patologia animală și vegetală, este cel cu genomul segmentat. Acestea sunt denumite *virusuri cu genom divizat* sau *virusuri cu genom multipartit*, ținând cont de faptul că materialul genetic este distribuit în mai multe particule nucleo-proteice. *Virusurile cu genom divizat* sunt incluse în două subcategorii: prima cuprinde virusurile la care capsida virală învelește mai multe segmente de ARN, diferite ca mărime și structură și care sunt replicate separat. Cea de-a doua cuprinde în special virusuri ale plantelor și la care segmentele de ARN nu sunt încapsidate împreună, ci individual, în mai multe capside. De exemplu, virusul gripal conține 8 fragmente de ARN monocatenar, cu mărime și structură diferită, care sunt replicate separat de celula gazdă și care poartă informația necesară pentru sinteza componentelor virusului progen, iar reovirusurile conțin 10 - 12 segmente de ARN bicatenar. În cazul virusurilor care produc mozaicul la *Bromus* (obsigă) și la lucernă, genomul este alcătuit din 5 segmente de ARN monocatenar, incluse în capside diferite. Pentru producerea bolii este necesară infectarea plantei cu toate capsidele (pătrunderea în aceeași celulă a genomului „întreg" pentru a avea loc multiplicarea).

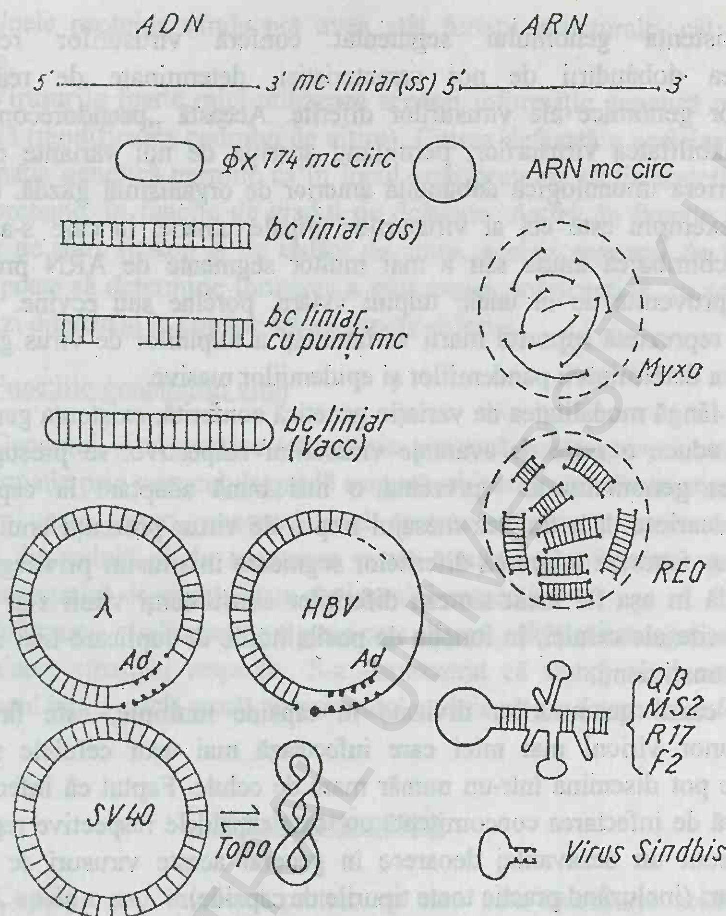


Fig. 46. Forme de genom viral ADN și ARN: *ADNmc* (*ss*) *liniar* (parvovirusuri); *ARNmc liniar* (picornavirusuri, virusul hepatitei A); *ADNmc circular*; *ADNbc* (*ds*) *liniar* cu punți monocatenare (fagul T5); *ADNbc liniar* cu extremitățile închise covalent (*Vacc* - genom de virus vaccinal); genom cu *ADNbc circular închis*, necovalent, prin extremități monocatenare adezive (*Ad*) complementare (bacteriofagul λ) sau cu extremități adezive mc-bc (virusurile hepadna - *HBV*); genom de ADNbc circular închis, covalent, în formă extinsă și supratorsionată (*supercoil*, *supertwist*, *superhelix*) într-un suprahelicoid al structurii bihelicoide bazale [structura extinsă este condiționată de legarea unor proteine de schimbare conformațională - topoizomeraze (*topo*)]; genom de virus gripal format din 8 molecule liniare inelare de ARN (*Myxo*); genom de reovirus format din 10 molecule liniare (bc) de ARN (*REO*); virusuri cu genom ARNmc intens pliat (conformația florală a moleculei de ARN) (fagii mici: *QB*, *R17*, *MS2*, *f2*); secvență terminală complementară repetată în ordine inversă (*inverted terminal repetition*) de tipul abc-a′b′c′ (*virus Sindbis*).

Existența genomului segmentat conferă virusurilor respective posibilitatea dobândirii de noi caracteristici, determinate de reasortarea segmentelor genomice ale virusurilor diferite. Această „pseudorecombinare" crește variabilitatea virusurilor, permițând apariția de noi variante care pot învinge bariera imunologică dobândită anterior de organismul gazdă. Cel mai ilustrativ exemplu este cel al virusurilor gripale umane, la care s-a pus în evidență schimbarea unuia sau a mai multor segmente de ARN proprii cu segmente provenite de la unele tulpini aviare, porcine sau ecvine. Această schimbare reprezintă suportul marii variabilități a tulpinilor de virus gripal cu posibilitatea determinării pandemiilor și epidemiilor masive.

Pe lângă modalitatea de variație genetică conferită, existența genomului segmentat aduce o serie de avantaje virusurilor respective: se presupune că segmentarea genomului ar reprezenta o mai bună adaptare la capacitatea celulelor eucariote de a traduce mesajul impus de virus; prezența unui genom segmentat ar favoriza migrarea diferitelor segmente în situsuri privilegiate din celula gazdă în așa fel încât sinteza diferiților constituenți virali s-ar face în regiuni diferite ale celulei, în funcție de posibilitățile de replicare mai rapidă a diferiților constituenți.

În cazul genomurilor divizate în capside multiple, este favorizată existența unor virioni mai mici care infectează mai ușor celulele și după replicare se pot disemina într-un număr mare de celule. Faptul că infecția este condiționată de infectarea concomitentă cu toate capsidele respective reprezintă numai aparent un dezavantaj deoarece în general aceste virusuri se află în cantități mari (incluzând practic toate tipurile de capside).

Existența acestor virusuri ilustrează modalitatea prin care virusurile fac economie de material genetic.

În general virusurile sunt obligate să facă economie de material genetic, datorită dimensiunilor foarte mici ale virionilor care nu permit împachetarea unui genom foarte mare. Ea se realizează pe mai multe căi ilustrate de diferite virusuri. În cazul tuturor virusurilor, structura capsidei realizată prin gruparea unui număr mic de proteine sau a unui singur tip de proteină, necesită exprimarea unei singure sau a câtorva gene.

Unele enzime care participă în replicarea virusurilor sunt numai parțial codificate de genomul viral, restul enzimei fiind format din proteine care aparțin gazdei.

Unele proteine virale pot avea atât funcții structurale, cât și funcții de reglare.

Virusurile foarte mici utilizează aceeași informație genetică prin citirea ei defazată (modificarea cadrului de citire). Citirea defazată a aceleiași secvențe de informație genetică permite ca în locul unei proteine să fie sintetizate două sau trei proteine, în funcție de gradul de defazare. Astfel, în funcție de poziția punctelor de start și stop și de cadrul de citire, același segment de informație genetică poate să determine formarea a numeroase polipepetide, cu secvențe de aminoacizi diferite și în consecință cu funcții diferite.

Funcțiile genomului viral

Genomul viral conține informație genetică pentru propria sa replicare plus informație prin care celula gazdă asigură arhitectura particulei virale.

În unele cazuri, genomul viral conține informația necesară eliberării virusului din celulă și de asemenea poate conține și informație genetică ce asigură potențialul de variabilitate al virusului respectiv.

Informația virală conține și gene care asigură infecțiozitatea genomului viral plus virulența virusului respectiv. S-a demonstrat că atunci când este introdus experimental într-o celulă gazdă numai acidul nucleic singur determină infecția.

Capsida și simetria

Capsida sau învelișul proteic cu care este înconjurat acidul nucleic viral, reprezintă cea mai mare parte din masa unui virus (în special a celor mici). Studiul organizării capsidei este important deoarece dezvăluie principiul după care macromoleculele biologice se asamblează în structuri complexe. Capsida este alcătuită din subunități numite **capsomere**. Avantajul construcției virale din subunități este dublu: ◆ reduce necesarul de informație genetică și ◆ favorizează autoasamblarea proteinelor capsidale. S-a reușit asamblarea particulei virale *in vitro* prin combinarea acidului nucleic purificat cu proteine purificate, în absența celulelor, sursei de energie și enzimelor.

Fiecare capsomeră, formată dintr-un singur tip sau câteva tipuri de proteine (**protomere**) poate fi evidențiată la microscopul electronic sub forma unei particule aproximativ sferice, uneori cu o cavitate centrală. Aranjamentul

capsomerelor dă structurii virusului simetria sa geometrică. Pentru capsidele virale există 3 forme de simetrie:

1) helicală, în care capsomerele sunt aranjate în spirală (helix) formând un cilindru gol în interior. Această formă poate fi rigidă sau flexibilă. Exemple de virusuri cu acest tip de simterie: V.M.T., influenza, virusul rabiei.

2) cubică sau icosaedrică, în care capsomerele sunt aranjate după o formă geometrică ce corespunde unui icosaedru. Icosaedrul este un poliedru regulat, având 20 de fețe, toate triunghiuri echilaterale, 30 de muchii sau creste și 12 vârfuri (vertexuri). Exemple de virusuri cu acest tip de simetrie: poliovirus, adenovirus, herpesvirus.

3) binară sau **mixtă**, caracteristică unor virusuri cu structură foarte complexă alcătuită dintr-un cap cu simetrie icozaedrică și o coadă cu simetrie helicală. Exemple de virusuri cu acest tip de simetrie: bacteriofagii mari: T_2, T_4 și T_6 care parazitează *Escherichia coli*. Ei reprezintă un grup special de virusuri, numite **virusuri complexe** (Fig. 47), din care mai fac parte poxvirusurile (virusurile variolei și vaccinei). Poxvirusurile au o formă ovoidă sau de cărămidă și se deosebesc prin aceea că prezintă un miez central reprezentat de acidul nucleic dar sunt lipsite de o capsidă simetrică, în locul căreia au mai multe straturi de lipoproteină și structuri fibrilare asociate suprafeței externe, care dau virionilor un aspect striat caracteristic pe preparate colorate negativ. ADN viral asociat cu proteinele formează un „nucleoid" de forma unui disc biconcav.

La unele virusuri (cum este VMT) capsomerele reprezintă cele mai mici structuri care se văd la microscopul electronic pe suprafața particulei virale. Ele sunt unități morfologice și în același timp unități structurale sau biochimice (unități de proteine sau protomere). În acest caz capsomerele sunt monomere.

La virusurile cu capside icosaedrice, capsomerele sunt oligomere fiind reprezentate ca unități morfologice de **pentoni** (grupări de 5 unități structurale) și **hexoni** (grupări de 6 unități structurale). Unitățile structurale de proteină sau protomerele repetitive care formează capsida trebuie aranjate într-o arhitectură regulată care utilizează legături între aceleași perechi de grupări chimice. Aceasta se realizează în diferite moduri la capsidele icosaedrice și helicale după cum relevă studiile de cristalografie în raze X.

Forma și dimesiunea capsidelor depind de caracteristicile protomerelor constituente și, pentru capsidele helicale, de lungimea acidului nucleic.

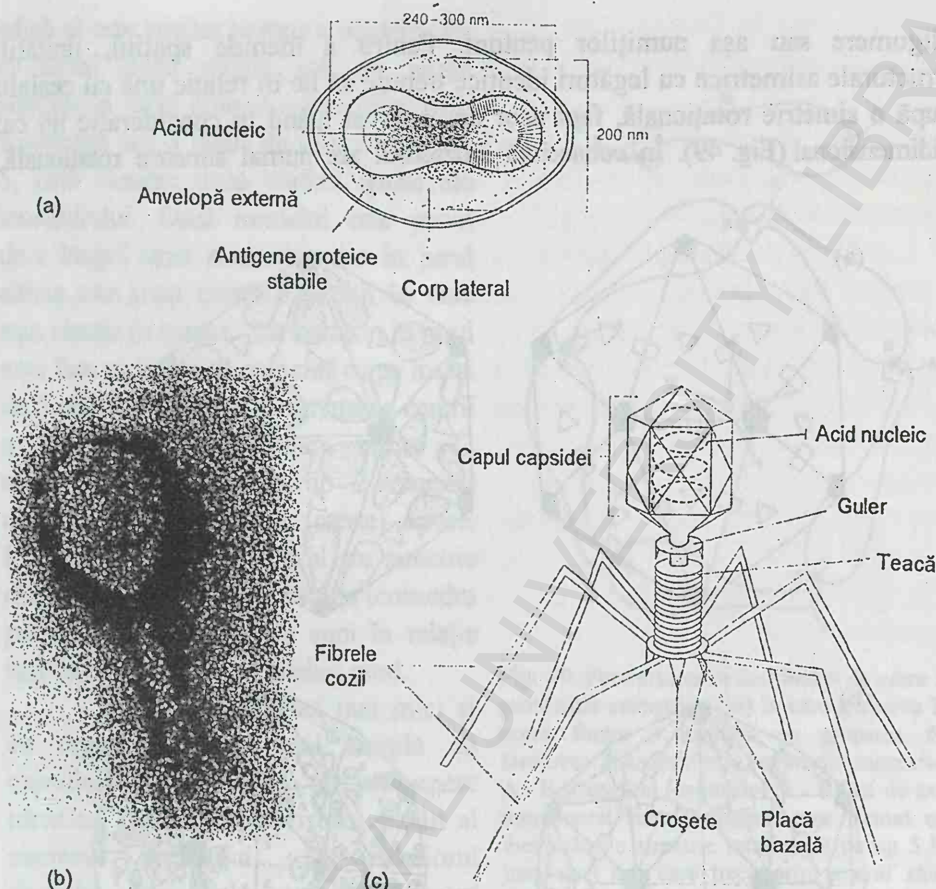


Fig. 47. Structura detaliată a virusurilor complexe. (a) Virusul vaccinei, un poxvirus. (b) Microelectronografie și (c) schemă a unui bacteriofag T4.

Capsidele icozaedrice. Forma icosaedrică a numeroase virusuri, considerate inițial sferice (izodiametrice) este de un interes considerabil pentru arhitectura moleculară a virusurilor, deoarece icosaedrul este singurul înveliș perfect închis care poate fi realizat cu protomere identice. Cel mai simplu icosaedru este o formă geometrică cu 12 vârfuri și 20 de fețe triunghiulare (Fig. 48). În fiecare vârf (vertex) se întâlnesc 5 fețe ale poliedrului. Pentru a realiza un înveliș (capsidă) trebuie să existe 60 de protomere - trei per față - fiecare localizată spre unul din vârfuri (Fig. 48a) și toate conectate una cu cealaltă în același mod. Cele 5 protomere din jurul fiecărui vertex formează împreună grupări recunoscute la microscopul electronic corespunzând capsomerelor

oligomere sau așa numiților pentoni. Pentru a închide spațiul, unitățile structurale asimetrice cu legături identice trebuie să fie în relație una cu cealaltă după o simetrie rotațională, fapt ușor de observat luând în considerație un caz bidimensional (Fig. 49). În consecință icozaedrul are numai simetrie rotațională,

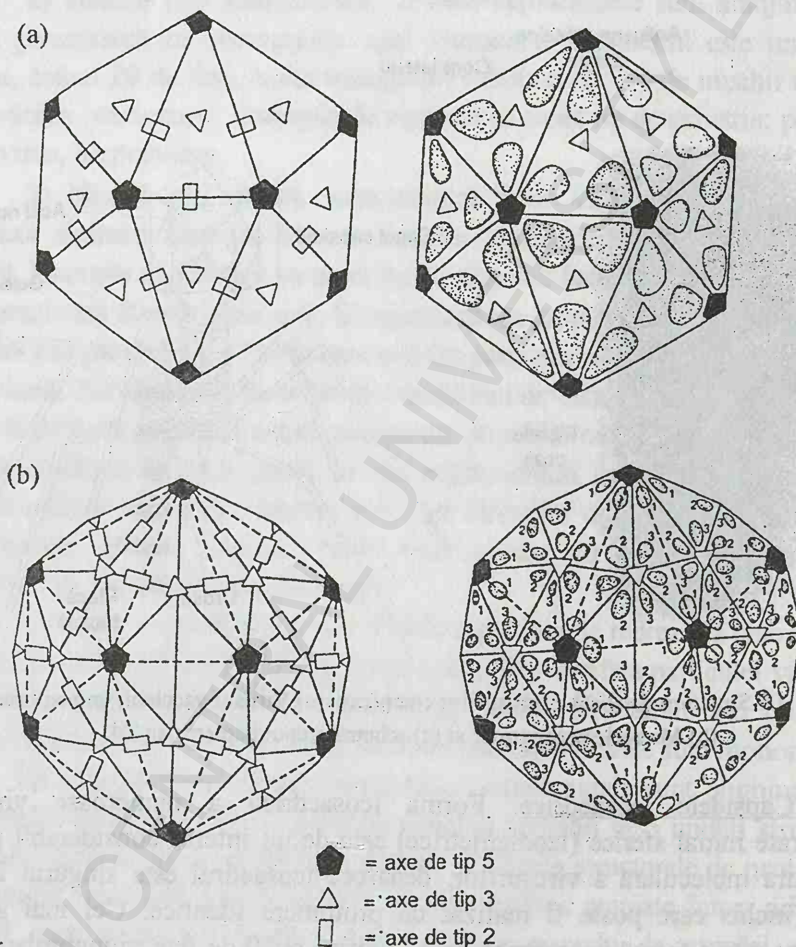


Fig. 48. (a) Icozaedru de bază. Reprezentarea din stânga arată fețele triunghiulare cu pentoni la fiecare vertex; cea din dreapta prezintă pozițiile monomerelor în jurul axelor de tip 5. (b) Un icozaedru derivat (T = 3). Fiecare față triunghiulară a icozaedrului prezentat în (a) este subdivizată în 6 jumătăți de triunghiuri. Muchiile fețelor obținute trasate cu linie neîntreruptă, cele ale fețelor de bază cu linii punctate. Monomerele sunt aranjate în pentoni în jurul axelor de tip 5 și în hexoni în jurul axelor de tip 3. 1, 2, 3 monomere cvasiechivalente.

adică el este readus pentru a coincide cu el însuși după rotația sub un unghi adecvat în jurul anumitor axe (Fig. 48). Icozaedrul are 3 feluri de axe: axe de tip 5, care reunesc două vârfuri opuse ale icosaedrului. Dacă modelul este privit de-a lungul unei asemenea axe în jurul căreia este rotat există 5 poziții în care este identic (o rotație - tur complet în jurul axei face ca figura să coincidă cu ea însăși de 5 ori); axe de tip 3 care reunesc centrii a două fețe triunghiulare opuse (3 coincidențe) și axe de tip 2 reunind mijlocul a două muchii (creste) opuse. Din acest motiv, icozaedrul are simetrie rotațională de tip: 5:3:2. Într-un icozaedru perfect toate protomerele sunt în relație una cu cealaltă în exact același mod.

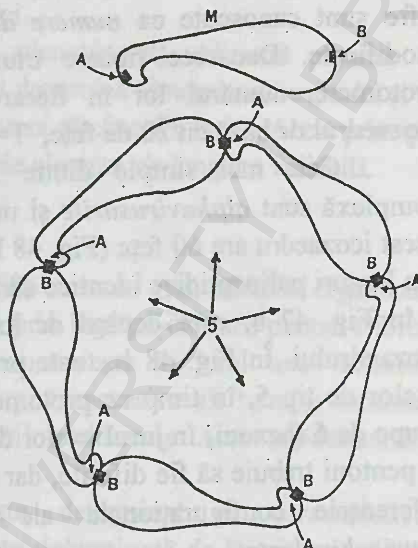


Fig. 49. Formarea unui inel închis de către 5 protomere asimetrice (M) în care gruparea B poate forma o legătură cu gruparea A. Deoarece distanța dintre legăturile succesive A - B și unghiul legăturilor A - B față de axa monomerei sunt constante, este format un inel având o simetrie rotațională de tip 5 în jurul unei axe care trece prin centrul său.

Numai virionii cei mai mici și cu organizarea cea mai simplă au capsidele alcătuite din 60 protomere identice. De exemplu: virusul satelit al necrozei tutunului. În interiorul capsidei este inclus un ARN scurt (aproximativ 1600 baze) cu o singură genă, cea pentru protomera capsidei. Datorită simplității sale acest virus se multiplică numai în celulele infectate cu virusul necrozei tutunului, care furnizează proteinele necesare pentru replicarea sa (de unde numele de satelit). În condiții adecvate protomerele acestui virus se pot asambla spontan, mai întâi în pentoni, care apoi se leagă pentru a forma capside icosaedrice (autoasamblare).

Majoritatea altor virusuri icozaedrice au mai mult de 60 protomere per virion. Ele nu pot forma icozaedre riguroase, ci formează icozaedre aproximative, după o modalitate pe care o prezentăm în continuare. Într-un icozaedru, fețele triunghiulare pot fi subdivizate într-un număr de triunghiuri

mai mici, ceea ce duce la generarea de **icozaedre modificate**. Numărul cel mai mic de triunghiuri descris per faţă este 3, urmat de 4, 7, 9, 12, ş.a.m.d. Aceste cifre sunt cunoscute ca *numere de triangulare* (T) ale diferitelor icozaedre modificate. Deoarece fiecare triunghi înscris trebuie din nou să aibă 3 protomere, numărul lor în fiecare icozaedru modificat este 60xT. Pentru icozaedrul de bază cu 20 de feţe, T=1.

Cele mai simple dintre virusurile cu organizare icozaedrică mai complexă sunt *alphavirusurile* şi unele virusuri ale plantelor pentru care T=3; acest icozaedru are 60 feţe (Fig. 48 b). Capsidele conţin 180 protomere alcătuite din lanţuri polipeptidice identice dar cu 3 configuraţii diferite indicate prin 1,2 şi 3 în Fig. 47 b, care depind de localizarea fiecărui protomer faţă de axele icozaedrului. În Fig. 48 b. toate protomerele nr. 1. formează pentoni în jurul axelor de tip 5, în timp ce protomerele nr. 2 şi nr. 3 sunt aranjate regulat în grupe de 6 (hexoni) în jurul axelor de tip 3. Relaţiile dintre protomere în hexoni şi pentoni trebuie să fie diferite, dar diferenţele sunt mici şi pot fi observate din diferenţele configuraţionale ale aceluiaşi lanţ polipeptidic (*principiul cvasiechivalenţei*).

La virusurile icozaedrice mai complexe capsidele au un număr mai mare de protomere şi capsomere. De asemenea, cele două tipuri de capsomere sunt alcătuite din proteine diferite, cu aranjamente care uneori deviază de la schema de bază a icozaedrului. De exemplu la adenovirus (T=25), hexonii conţin 3 în loc de 6 protomere, întreţinând capacitatea de a face contactul fiecare cu alte 6 capsomere. Acest aranjament este compatibil cu simetria icozaedrică deoarece axele care străbat hexonii sunt de tip 3 (Fig. 47b). În construcţia capsidelor hexonii de acest tip, care sunt cele mai abundente capsomere, adesea se leagă între ei pentru a forma unităţi structurale complexe cu o reţea hexagonală strâns împachetată. Aceste unităţi se asamblează apoi în capside. Configuraţia lanţurilor polipeptidice trebuie însă să fie diferită, depinzând de fiecare hexon în asamblarea finală, dacă este la centrul unei feţe a icozaedrului de bază, la vârf sau adiacent unui penton.

Aceste capside complexe nu se pot forma prin autoasamblare. În principiu hexonii sunt capabili de a realiza, prin autoasamblare, învelişuri plate sau cilindrice; formele cilindrice sunt evidenţiate în celulele infectate cu unele mutante virale care sunt incapabile de a face o capsidă completă. Dimpotrivă, pentonii alcătuiesc vârfuri; în combinaţie cu hexonii, care formează feţe plate,

ei permit formarea unui înveliș închis, aproximativ icozaedric, cu pentoni aflați în axele de simetrie de tip 5 și hexoni între ei.

Virusurile mari (ca fagul T4 sau adenovirusul) utilizează proteine de eșafodaj sau un mulaj pentru capsidă. Mulajul determină dimensiunile capsidei și un număr de hexoni, în timp ce numărul de pentoni rămâne fix la 12. Acest principiu explică modul în care pot fi asamblate capsidele alungite, de lungime variabilă.

Capside cu simetrie helicală

Casida helicală, cilindrică (Fig. 50) are cea mai simplă organizare. Protomerele identice sunt legate cap la cap prin legături chimice pentru a forma o structură tubulară spiralată, care se construiește în jurul axei helixului (Fig. 51). Protomerele din două tururi de spiră succesive ale tubului formează fiecare legături cu două protomere ale tururilor adiacente. Acest model conferă mare stabilitate structurii.

Diametrul capsidei helicale este determinat de caracteristicile protomerelor sale, în timp ce lungimea este determinată de lungimea acidului nucleic pe care îl include.

În capsidele helicale, ARN este localizat într-o scobitură care urmează un traseu helical în protomere (Fig. 52), de care este atașat prin multiple legături slabe, indiferent de secvență.

Un virus tipic cu simetrie helicală este V.M.T.. Acesta este un virus ARN în care 2130 de subunități proteice (fiecare alcătuite din 158 aminoacizi) sunt aranjate într-un helix. La VMT, helixul are 16 1/2 subunități per tur de spiră și dimensiunile globale ale particulei virale sunt 18 x 300 nm.

În timp ce capsida unor virusuri nude cu simetrie helicală (V.M.T.) este rigidă, capsidele virusurilor anvelopate cu simetrie helicală (ca paramyxovirusurile) sunt foarte flexibile. În cazul acestor din urmă virusuri, întrega capsidă și nu numai acidul nucleic este răsucită în interiorul anvelopei (Fig. 50). La aceste virusuri anvelopa și nu capsida furnizează bariera necesară față de acțiunea nucleazelor. Coada unor bacteriofagi (de exemplu T4) are de asemenea o simetrie helicală, dar nu conține acid nucleic; lungimea sa este determinată de lungimea unei proteine filiforme în jurul căreia se asamblează.

Funcțiile proteinelor care alcătuiesc capsida (ca înveliș) sunt de a proteja materialul genetic în cursul existenței extracelulare a virusurilor și de a favoriza adsorbția virusului pe celula gazdă și deci eficiența cu care virusul o infectează.

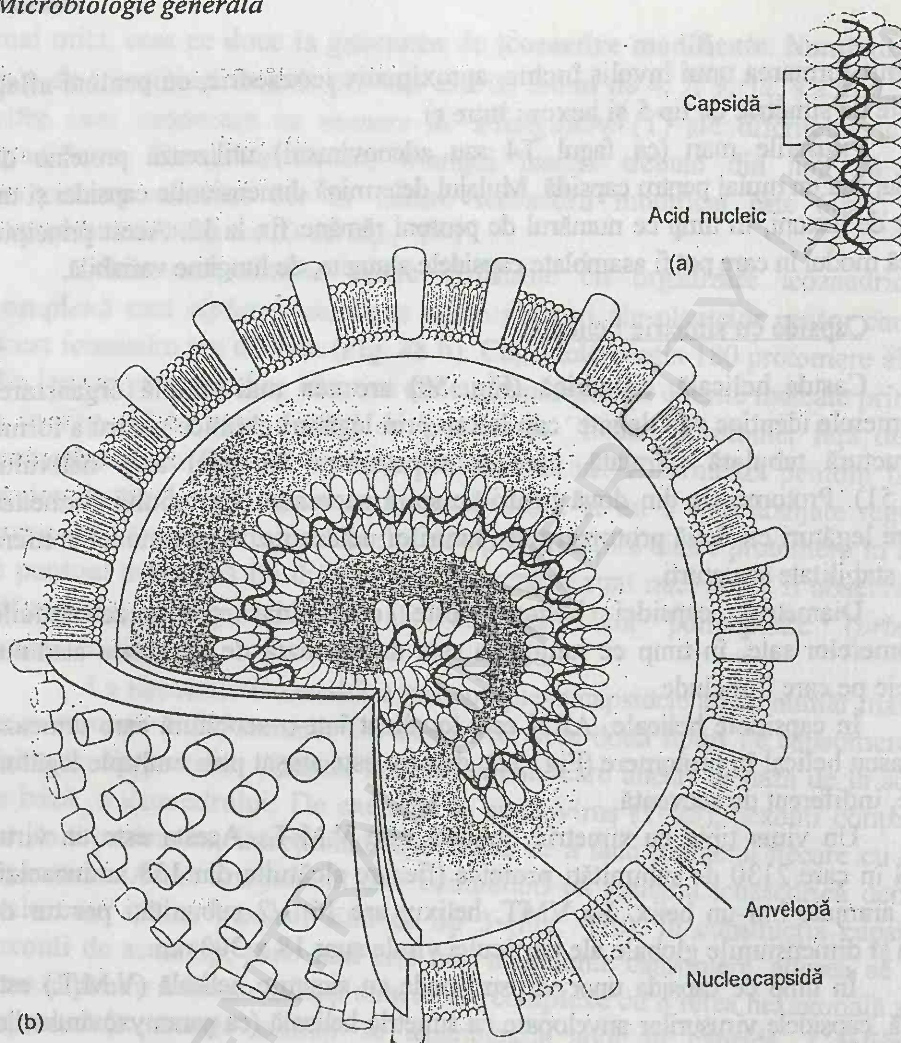


Fig. 50. Tipuri de virusuri cu nucleocapside helicale. Reprezentare schematică: (a) virusul mozaicului de tutun (VMT - cu capsidă rigidă) și (b) virus anvelopat cu capsidă flexibilă (influenza).

Celulele animale (și bacteriene) pot fi infectate cu acid nucleic pur prin transfecție, procesul fiind însă lipsit de specificitate.

Pentru multe virusuri care infectează organismul uman și al animalelor, atașarea virusurilor la receptorii specifici de pe suprafața celulei gazdă (ca interacțiune a proteinelor virale capsidale cu receptorul celular) este determinantul major al specificității de specie și organ. Capacitatea acestor

virusuri de a infecta cu predilecție anumite specii, anumite țesuturi și anumite celule, este cunoscută sub denumirea de **tropism** (respectiv geno-, histo- și citotropism). Virusurile sunt prin definiție citotrope.

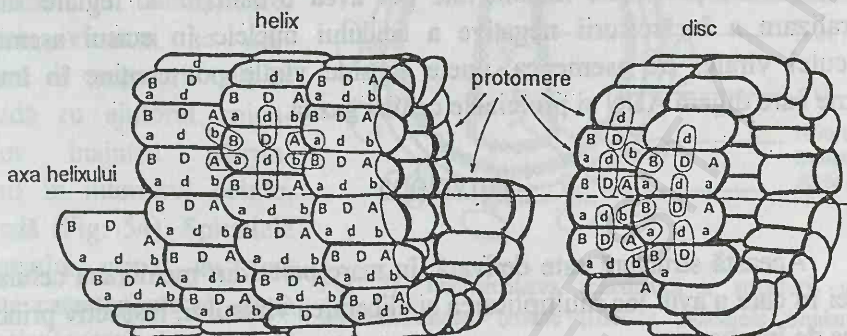


Fig. 51. Constituirea unei capside helicale. Toate protomerele sunt identice și stabilesc legături, repetate regulat cu cele vecine, între grupările chimice indicate prin litere. Deoarece fiecare protomeră este deplasată față de vecinele ei laterale, ea formează legături cu două dintre ele pe fiecare latură de-a lungul axei helixului. Aceasta conferă stabilitate considerabilă capsidei. Protomerele se asamblează mai întâi pentru a constitui discuri plate nehelicale conținând 2 inele de protomere, cu un aranjament modificat în helixul final. În condiții fiziologice, când protomerele discurilor se asociază cu ARN, ele se deplasează ușor pentru a produce un helix. Helixul crește în lungime prin adiție și asimilare de discuri.

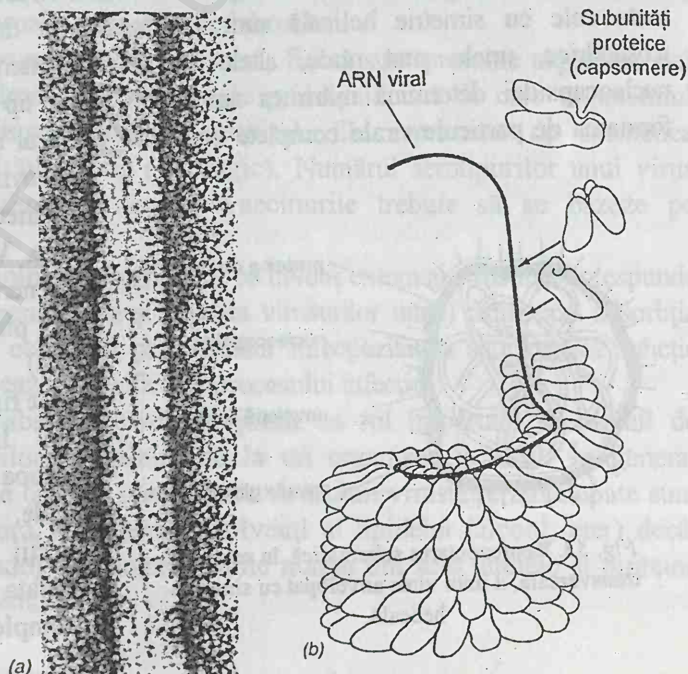


Fig. 52. Structura și modul de asamblare a unui virus simplu, VMT. (a) Microelectronografie de înaltă rezoluție a unei porțiuni a particulei virale (b) Asamblarea virionului.

În unele cazuri în interiorul capsidei virale se pot găsi o serie de **proteine interne**. Unele dintre acestea sunt asociate cu acidul nucleic, ca de exemplu polimerazele, esențiale pentru replicare(pentru sinteza de ADN și ARN). Altele, proteinele *histone-like* pot avea o funcție de reglare sau de neutralizare a încărcăturii negative a acidului nucleic în cursul asamblării particulei virale. De asemenea, unele capside virale pot conține în interior enzime care digeră ADN și proteinele celulei gazdă.

Anvelopa

Această structură este derivată, în mare parte din membrana celulară a celulei în care a avut loc multiplicarea și eliberarea virusului, respectiv printr-un proces de înmugurire.

Anvelopa este un înveliș extern al virusului, *o membrană lipoproteică* alcătuită din *lipide* provenite din membrana celulară și *proteine* specificate de virus. La unele virusuri, o altă proteină, așa numita *proteină de matrice* (Fig. 53) mediază acțiunea între proteinele capsidale și anvelopă.

Anvelopa este o structură accesorie. În cazul virusurilor umane de exemplu, toate cele cu simetrie helicală sunt anvelopate, în timp ce dintre virusurile icosaedrice, unele sunt nude, altele cu înveliș extern. În principiu, forma nucleocapsidei determină mărimea anvelopei. Acest tip de control conduce la formarea de particule virale complete uniforme. În cazul nucleocapsidelor helicale (myxovirusuri) virionii manifestă o varietate de dimensiuni și forme. Virusurile anvelopate au în general o formă sferică dar sunt pleomorfe (variabile ca formă) deoarece anvelopa nu este rigidă.

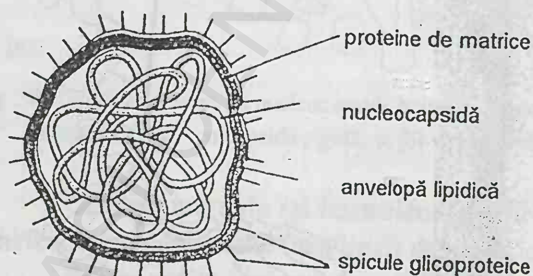


Fig. 53. Reprezentarea schematică, în secțiune transversală, a unui virus anvelopat cu simetrie helicală.

În funcție de virus, anvelopa poate prezenta sau nu **spicule**, sub forma unor proiecții implantate pe suprafața virusului, reprezentate de complexe glicoproteice.

Prezența spiculelor (gp = glicoproteine) este o caracteristică remarcabilă a unor virusuri, care poate fi utilizată în identificare. Unele virusuri se atașează de receptorii celulei gazdă cu ajutorul spiculelor înaintea pătrunderii în interiorul celulei gazdă (Fig. 54). Spiculele virusului gripal au fost bine caracterizate și, după particularitățile pe care le au, aparțin la două categorii numite: hemaglutinine și neuraminidaze.

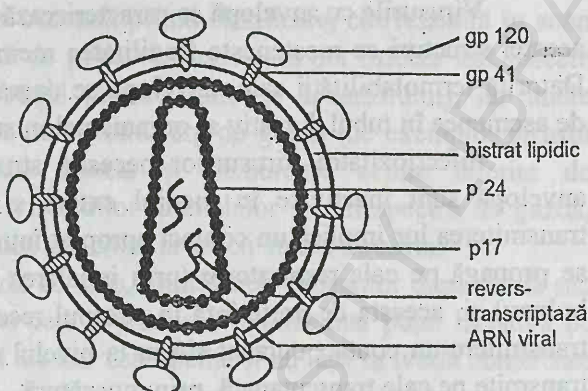


Fig. 54. Reprezentarea schematică a structurii virusului imunodeficienței umane (HIV-1). Spiculele implantate în anvelopă (gp 120) interacționează specific cu receptorul CD4 de pe limfocitele T inițiind pătrunderea virusului și infecția.

Capacitatea anumitor virusuri (de ex. virusul gripal) de a aglutina hematii este asociată spiculelor (hemaglutinine). Hemaglutinarea rezultată, constituie baza a numeroase teste utile de laborator.

Proteinele de suprafață ale virusului, fie că sunt proteine capsidale sau glicoproteine de anvelopă, sunt antigenele principale fată de care organismul gazdă dezvoltă răspunsul imunitar antiviral. Ele reprezintă de asemenea determinanții specificității de tip (serologic). Numărul serotipurilor unui virus este important de cunoscut, deorece vaccinurile trebuie să se bazeze pe serotipurile prevalente.

<u>Semnificația biologică a anvelopei,</u> ca înveliș extern al virusului, corespunde unei structuri care în general (ca și capsida virusurilor nude) facilitează adsorbția virusului pe suprafața celulei și prin aceasta infecțiozitateta sa. Această funcție conferă în foarte multe cazuri specificitate procesului infecțios.

Prezența sau absența anvelopei joacă un rol important în modul de transmitere a virusurilor animalelor de la un organism la altul. În general prezența unei anvelope conferă instabilitate virusului: virusurile anvelopate sunt mai sensibile la căldură, detergenți și solvenți ai lipidelor (alcool, eter) decât cele neanvelopate (nude) care sunt alcătuite numai din acid nucleic și proteine capsidale (nucleocapsidă).

Virusurile cu anvelopă se caracterizează printr-o mare fragilitate, proprie acestei structuri ce moştenește fragilitatea membranei celulare din care derivă. Datorită termolabilității sale, anvelopa se degradează rapid în mediul extern și de asemenea în tubul digestiv al organismelor, sub acțiunea enzimelor.

Infecțiozitatea virusurilor necesită structuri intacte, ori virusurile cu anvelopă sunt inactivate în mediul extern și în materiile fecale. De aceea transmiterea lor implică un contact apropiat între subiecți. Astfel, virusul gripal se propagă pe cale respiratorie (prin inhalarea picăturilor lui Pflüge emise de bolnav) și, aceasta de preferință în sezonul rece. Herpesvirusul necesită pentru transmitere un contact cutanat și/sau la nivelul mucoaselor, iar virusul rabic se transmite pe cale transcutanată, prin mușcătură.

Prin comparație, virusurile neanvelopate (nude) rezistă mai bine în mediul extern și în tubul digestiv, fiind transmise la distanță pe cale hidrică (poliovirus), prin instrumente utilizate în oftalmologie (adenovirus) etc.

Clasificarea, cultivarea și identificarea virusurilor

Clasificarea și nomenclatura virusurilor

După 1960 - 1966, s-a conturat un acord general privind necesitatea clasificării științifice a virusurilor într-un singur sistem și a separării lor în acest sistem de toate celelalte entități biologice. Deși au o structură acelulară și deci nu sunt incluse în sistemele de clasificare a lumii vii, virusurile sunt suficient de diverse pentru a necesita o schemă de *clasificare* care să ajute studiul și identificarea lor. La modul general au fost deja menționate unele categorii introductive de clasificare a virusurilor, ca: virusuri ale plantelor, animalelor, bacteriilor; virusuri nude și anvelopate; virusuri ADN și ARN; virusuri helicale, icosaedrice, complexe. Aceste categorii sunt utile în organizarea datelor despre virusuri și pentru descrierea lor, dar studiul virusurilor specifice necesită o metodă de clasificare mai standardizată.

Inițial clasificarea virusurilor s-a bazat pe faptul că în general spectrul de gazdă (tipul de celule pe care le va infecta un virus) este restrâns. Astfel, virusurile care infectează numai bacteriile au fost numite bacteriofagi; cele care infectează celulele animale - virusuri ale animalelor și cele care infectează celule

vegetale - virusuri ale plantelor. Această primă clasificare, convenabilă în scop practic, este neştiinţifică. Există de pildă virusuri care pot infecta atât insecte cât şi plante (de exemplu: virusul piticirii galbene a cartofului), iar unele virusuri ale animalelor pot avea un spectru larg de gazdă (de exemplu: virusul stomatitei veziculare infectează insecte şi numeroase celule diferite de mamifere). Totuşi, majoritatea virusurilor animalelor au un spectru de gazdă, restrâns cu specificitate la Phylum sau chiar la specii strâns înrudite.

Utilizată o lungă perioadă de timp, clasificarea virusurilor după gazdă sau după boala (simptomatologie) pe care o produc a devenit mai puţin lucrativă pe măsură ce tot mai multe virusuri au fost descoperite şi au ieşit la iveală numeroase suprapuneri. Astfel s-a constatat că acelaşi virus poate avea mai multe gazde şi un număr divers de virusuri pot cauza un tip similar de simptome.

În cele din urmă a fost necesară adoptarea unui sistem care să ia în consideraţie însăşi particula virală, cu accent numai parţial pe gazdă şi boală. Astfel, criteriile principale utilizate în prezent pentru a grupa virusurile se referă în esenţă la structura şi compoziţia lor chimică, inclusiv organizarea moleculară a genomului.

În ultimele câteva decenii au fost izolate din plante, animale şi om sute de virusuri. Listele de virusuri se măresc cu regularitate pe măsură ce nişe noi (geografice şi/sau asociate gazdei) sunt cercetate şi pe măsură ce sensibilitatea şi specificitatea tehnicilor de detectare sunt din ce în ce mai bune. În diferite laboratoare de specialitate, centre de referinţă şi colecţii de culturi care comunică cu OMS, FAO şi alte agenţii internaţionale sunt înregistrate şi menţinute în prezent peste 30000 de virusuri, tulpini virale şi subtipuri.

În această situaţie se impune necesitatea unui sistem taxonomic universal, utilizabil, un sistem necesar pentru a ţine sub urmărire numărul mare de virusuri diferite care au fost izolate şi studiate în lume, ca şi pentru a asocia caracteristicile fiecărui virus cu numele acestuia.

Comitetul Internaţional de Taxonomie a Virusurilor (ICTV = *International Commitee on Taxonomy of Viruses*) este autoritatea care furnizează unicul sistem universal de clasificare şi nomenclatură a virusurilor care dă informaţii despre caracteristicile diferitelor grupe de virusuri. Acest sistem este util şi utilizabil, şi se bazează arbitrar pe nivele ierarhice de: ordin, familie, subfamilie, gen şi specie. Nivelele inferioare speciei (subspecie, tulpină, variantă etc.) sunt stabilite de experţi aparţinând unor grupuri speciale internaţionale şi colecţiilor de culturi.

Ultimul Raport (6) al ICTV prezintă o schemă taxonomică universală a virusurilor care cuprinde un ordin, 71 familii, 9 subfamilii, 164 genuri și peste 3600 specii de virusuri. Sistemul mai conține sute de virusuri cu poziție incertă datorită lipsei de date suficiente.

Figurile 55, 56, 57, 58, 59, furnizează reprezentări schematice ale virusurilor pe familii și genuri, în funcție de gazda lor majoră: bacterii, alge, fungi, protozoare, plante, nevertebrate și vertebrate. În cazul familiilor care cuprind virusuri ce infectează mai multe gazde, sunt indicate genurile pentru care respectivul grup este gazda primară. De exemplu, pentru familiile de virusuri care infectează plantele: *Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae, Bunyaviridae, Tospovirus.* În situația în care toate genurile au virusuri care infectează mai multe gazde se indică numai numele familiei. De exemplu: *Bunyaviridae* și *Picornaviridae* pentru familiile de virusuri care infectează Nevertebratele și Vertebratele. Toate diagramele sunt trasate în mod similar: taxonii sunt separați pe orizontală în cadre diferite pentru virusuri ARN și ADN și pe verticală pentru virusuri cu genomuri dublu catenare (ds) și monocatenare (ss). Sunt de asemenea indicați taxonii care conțin virusuri cu RT (reverstranscriptază) și genomuri ARNmc negativ (-) și pozitiv (+). Dacă într-una din aceste categorii nu a fost identificat nici un virus cadrul este gol sau nu este prezentat. Toate diagramele sunt trasate aproximativ la aceeași scală pentru a furniza indicații asupra dimensiunilor relative ale virusurilor. Această indicație nu este definitivă deoarece: 1) Dimensiunea și forma diferitelor virusuri din interiorul unei familii sau unui gen pot varia în anumite limite. În general dimensiunea și forma sunt redate pentru reprezentantul tip al taxonului. 2) Dimensiunile unor virusuri nu au fost determinate cu precizie. 3) Unele virusuri, în particular cele anvelopate mai mari, sunt pleomorfe. Sunt prezentate numai schemele majorității virusurilor celor mai mici iar pentru virusurile mari este prezentat conturul suprafeței sau secțiunea, în măsura în care aceasta relevă caracteristici morfologice majore.

Aprobarea unui singur ordin (Mononegavirales) până în prezent, reflectă intenția ICTV de a limita utilizarea acestui nivel numai pentru cazurile în care există dovezi concludente de relații filogenetice între virusurile familiilor care îl alcătuiesc.

Familia reprezintă nivelul stabil în ierarhia taxonomică virală ca și genul, definirea acestor nivele bazându-se tot mai mult pe dovezi filogenetice.

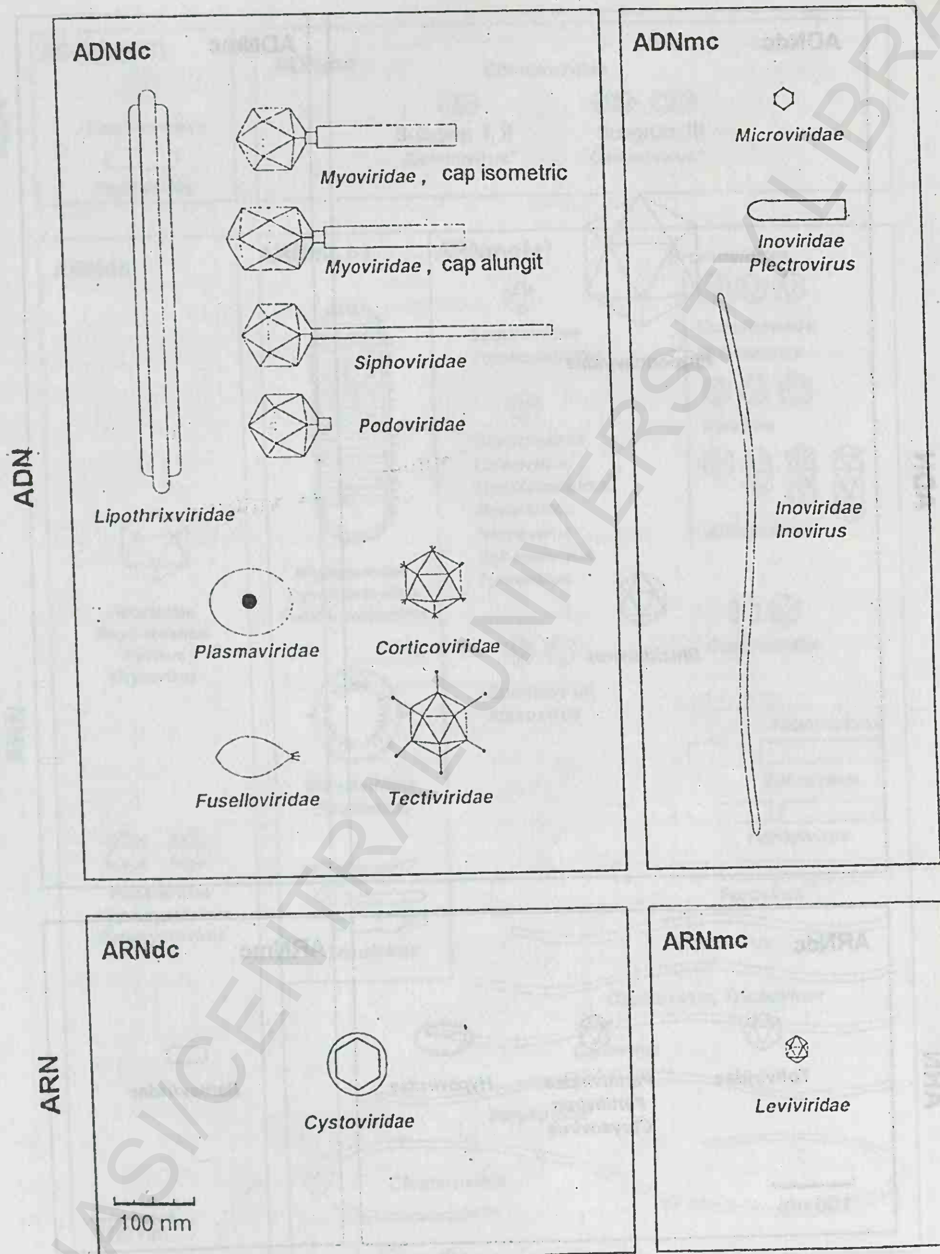


Fig. 55. Familii de virusuri care infectează bacterii.

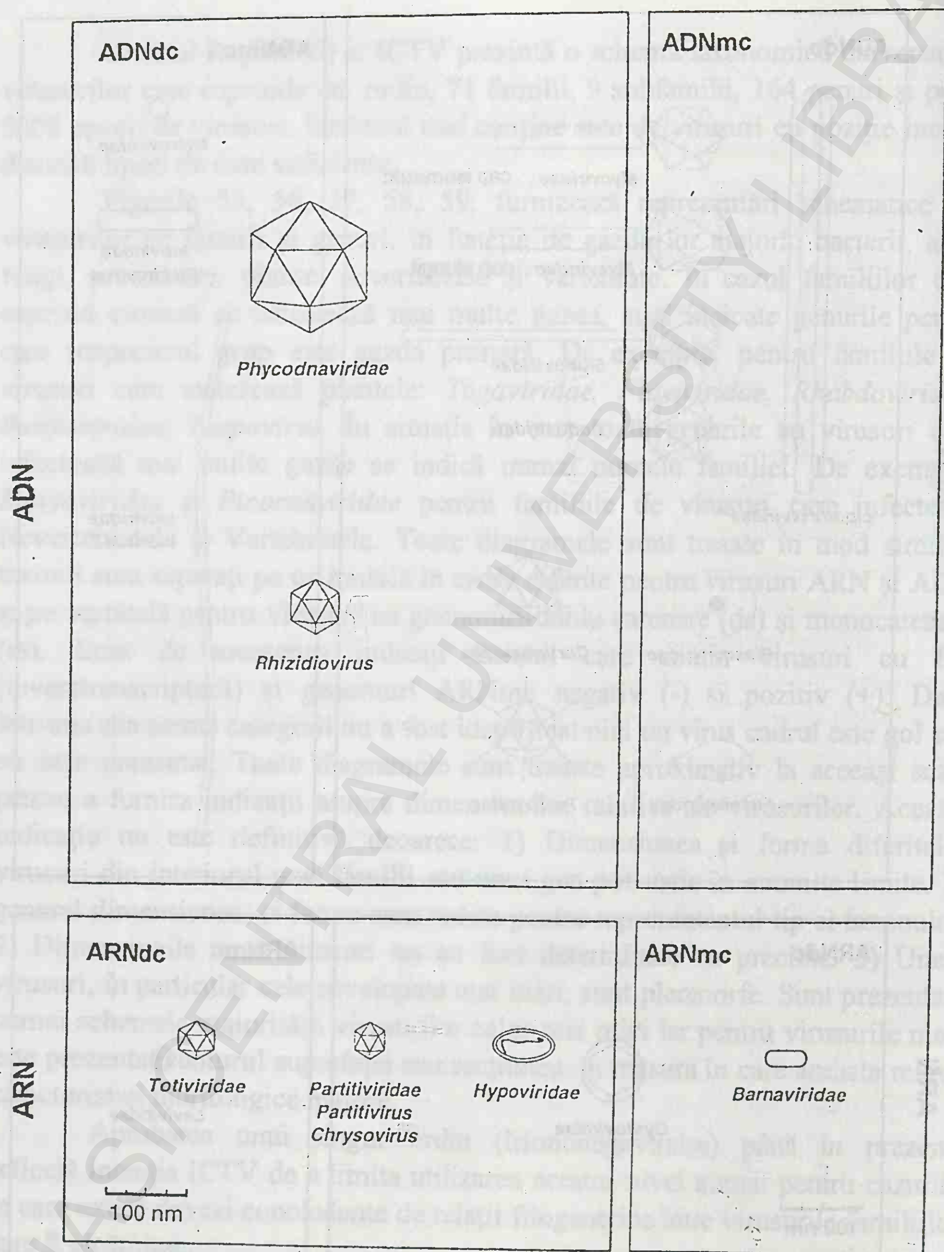


Fig. 56. Familii de virusuri care infectează alge, fungi și protozoare.



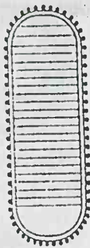


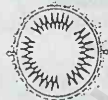














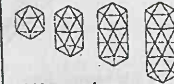






















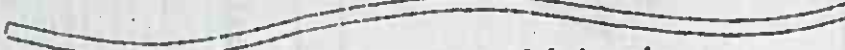








Fig. 57. Familii de virusuri care infectează plante.

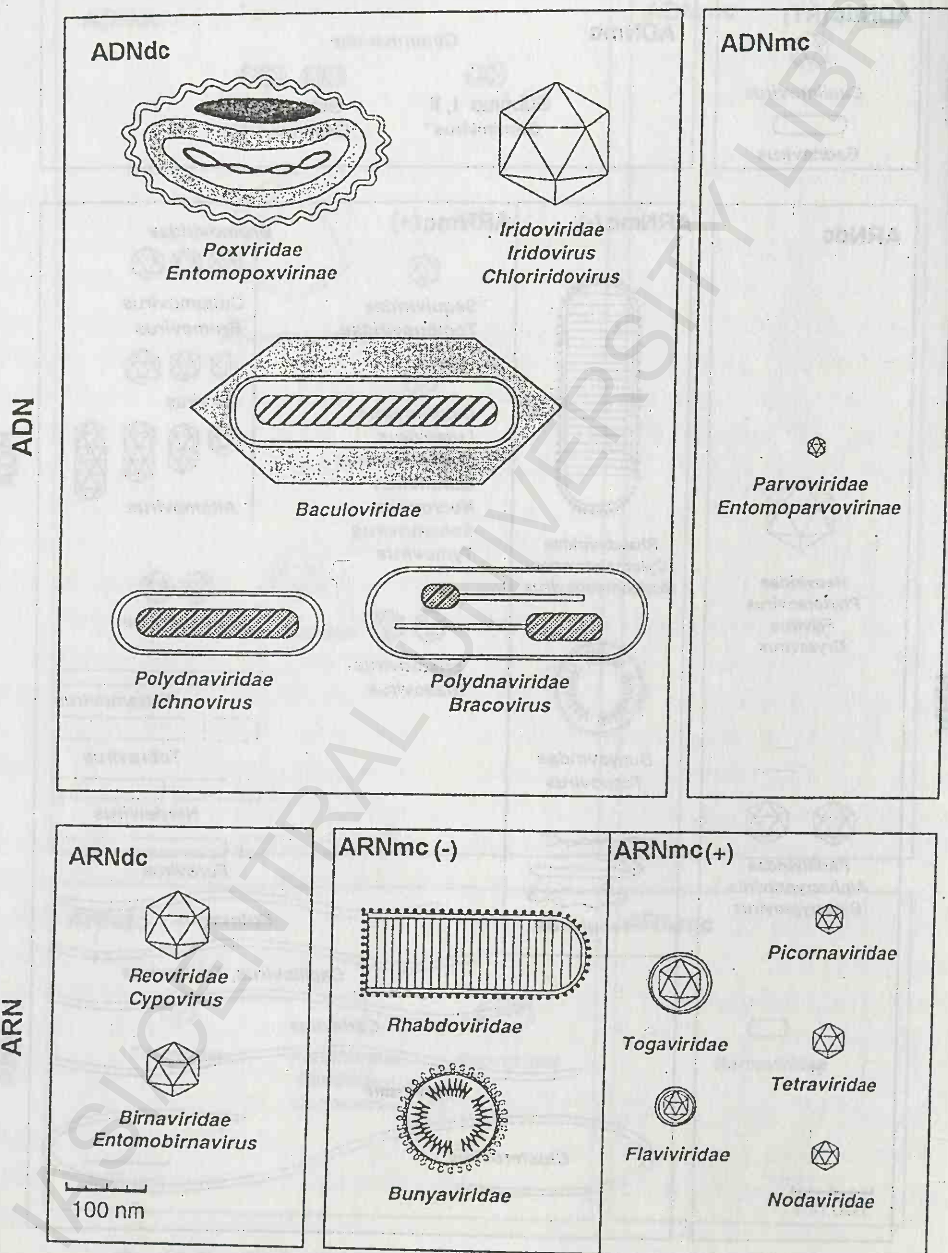


Fig. 58. Familii de virusuri care infectează nevertebrate.

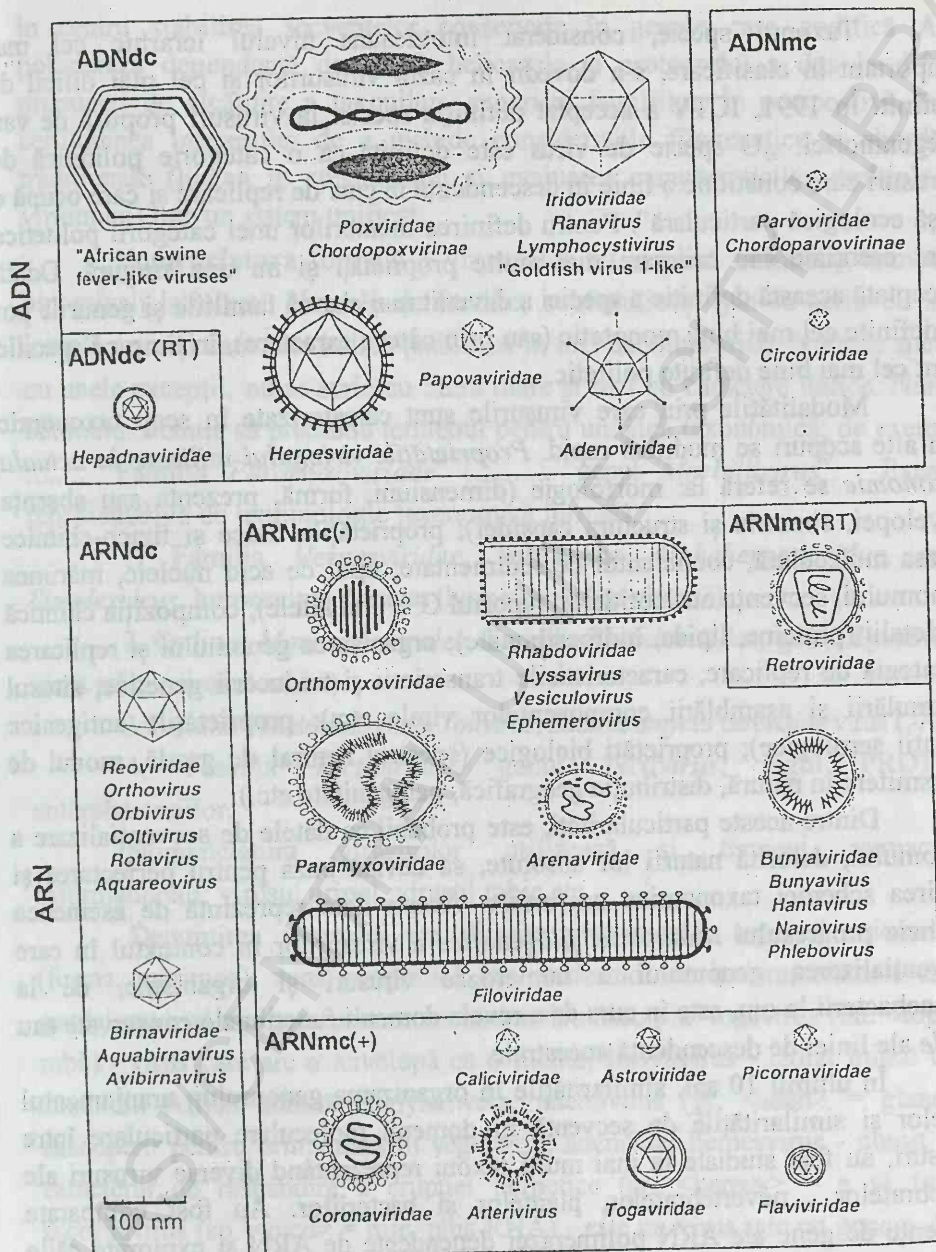


Fig. 59. Familii de virusuri care infectează vertebrate.

Taxonul specie, considerat întotdeauna nivelul ierarhic cel mai important în clasificare, s-a dovedit în cazul virusurilor și cel mai dificil de definit. În 1991, ICTV a acceptat definiția speciei la virusuri propusă de van Regenmortel: „O specie de virus este definită ca o categorie politetică de virusuri care constituie o linie în descendență în curs de replicare și care ocupă o nișă ecologică particulară". Pentru definirea membrilor unei categorii politetice sunt esenţiale sau necesare mai multe proprietăţi şi nu una singură. Odată acceptată această definiție a speciei a devenit mai clar că familiile și genurile pot fi definite cel mai bine monotetic (sau prin câteva caractere), în timp ce speciile sunt cel mai bine definite politetic.

Modalităţile prin care virusurile sunt carcaterizate în scop taxonomic sau alte scopuri se modifică rapid. *Proprietăţile virionului utilizate în actuala taxonomie* se referă la: morfologie (dimensiuni, formă, prezența sau absența anvelopei, simetria și structura capsidei); proprietățile fizice și fizico-chimice (masa moleculară, coeficientul de sedimentare, tipul de acid nucleic, mărimea genomului, secvența nucleotidelor, raportul G + C și altele); compoziția chimică în detalii (proteine, lipide, hidrocarbonate); organizarea genomului și replicarea (strategia de replicare, caracteristicile transcrierii și traducerii genetice, situsul acumulării și asamblării componentelor virale etc.); proprietățile antigenice (relații serologice); proprietăți biologice (spectrul natural de gazdă, modul de transmitere în natură, distribuție geografică, patogenitate etc.).

Dintre aceste particularități, este probabil ca datele de secvențializare a genomului, datorită naturii lor absolute, să devină baza pentru perfectarea și lărgirea schemei taxonomice universale. Aceste date reprezintă de asemenea și cheia progresului *taxonomiei filogenetice* a virusurilor în contextul în care secvențializarea genomului a numeroase virusuri și organisme, de la archaebacterii la om, este în curs de a revela domenii funcționale conservate sau *fosile* ale liniei de descendență ancestrale.

În ultimii 10 ani, similaritățile în organizarea genomului, aranjamentul genelor și similaritățile de secvență în domenii moleculare particulare între virusuri, au fost studiate la mai mulți taxoni reprezentând diverse virusuri ale vertebratelor , nevertebratelor, plantelor și bacteriilor. Au fost comparate secvențe de gene ale ARN polimerazei dependente de ARN și explorate căile posibile de evoluție a mai multor virusuri ARN sens pozitiv. Cercetarea mecanismelor posibile care stau la baza unor asemenea relații evolutive (având

în centru stabilirea secvențelor conservate în genele care codifică ARN polimeraza dependentă de ARN, helicazele și proteazele) a dus la diferite propuneri de alcătuire a taxonilor superiori familiilor. În perspectivă există certitudinea interesului de a include considerațiile filogenetice și abordările tradiționale (luarea în considerație și evaluarea caracteristicilor multiple ale virionului) într-un sistem unificat.

Nomenclatura formală a virusurilor nu implică utilizarea termenilor binominali latinizați. Numele de familie, subfamilie și gen se scriu cu literă inițială mare și caractere italice (subliniat în text dactilografiat). Numele speciei, cu unele excepții, nu se scrie cu literă mare și nici cu caractere italice. Numele taxonului trebuie să preceadă termenul pentru unitatea taxonomică; de exemplu: .... "Familia *Paramyxoviridae*" .... "genul *Morbillivirus*". Exemple reprezentative de terminologie taxonomică formală:

1. Familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesviridae*, genul *Simplexvirus*, herpesvirus 2 uman (herpes simplex virus 2).

2. Ordinul *Mononegavirales*, Familia *Rhabdoviridae*, genul *Lyssavirus*, virus rabic (virusul rabiei).

3. Familia *Totiviridae*, genul *Totivirus*, *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A.

4. Familia *Tectiviridae*, genul *Tectivirus*, fagul PRD1 al enterobacteriilor.

Nomenclatura virusurilor utilizează și termeni vernaculari, informaționali: virusul gripal, virusul rabic etc.

Denumirea virusului are diferite proveniențe: aspectul microscopic (forma, mărimea), zona geografică sau anatomică de izolare, efectele asupra gazdei sau mai multe caractere combinate. De exemplu: togavirus (lat. <toga> = robă) - virus care are o anvelopă ca o manta; bunyavirus - izolat inițial într-o zonă din Africa numită Bunyamwera; adenovirus (gr. <aden> = glandă) - descoperit pentru prima dată în vegetațiile adenoide; herpesvirus - numit după caracterul de răspândire a erupției herpetice (gr. <herpes> = a se furișa); picornavirus (sp. <pico> = mic, plus RNA) - este un virus mic cu genom ARN; reovirus (engl. = <u>r</u>espiratory <u>e</u>nteric <u>o</u>rphan) - un virus care infectează tractul respirator și intestinul și nu este strâns înrudit cu nici un alt virus.

Cultivarea virusurilor

Scopurile principale ale cultivării virusurilor sunt: (1) izolarea și identificarea virusurilor; (2) obținerea de preparate virale pentru vaccinuri; (3) realizarea cercetării detaliate a structurii virusurilor, ciclurilor de multiplicare, geneticii și efectelor asupra celulelor gazdă.

Evidențierea, enumerarea și identificarea virusurilor sunt complicate de faptul că virusurile nu se pot multiplica în afara celulelor vii. Pentru virusuri este astfel necesară furnizarea unor celule vii în locul unui mediu de compoziție chimică definită. Plantele și animalele vii sunt dificil și scump de menținut, iar în cazul virusurilor care infectează numai primatele superioare și omul apar complicații suplimentare. Pe de altă parte, virusurile care utilizează celulele bacteriene ca gazdă sunt relativ ușor de obținut pe culturi de bacterii. Din acest motiv, majoritatea cunoștințelor privind multiplicarea virusurilor provin de la bacteriofag, având în vedere că în ciuda diferențelor între virusuri (structură, genom, spectru de gazdă) mecanismul de bază al multiplicării este același pentru toate.

Cultivarea bacteriofagilor în laborator se poate realiza fie în suspensii de bacterii în mediu lichid, fie în culturi bacteriene dezvoltate pe mediu solid și se bazează pe liza celulelor bacteriene infectate de bacteriofagi. Consecința adăugării particulelor fagice într-o cultură lichidă de bacterii sensibile este faptul că celulele sunt omorâte (lizate) și cultura devine clară (lizat bacterian). Acest fapt are loc deoarece particulele fagice aderă la unele celule, care ulterior sunt distruse și eliberează particulele fagice progene ce pot infecta ulterior altă celulă **(ciclul litic)**. Utilizarea mediului solid face posibilă metoda plajelor folosită pentru evidențierea (indirectă) și numărarea virusurilor. Dacă celulele infectate sunt însămânțate în pânză pe suprafața mediului agarizat dintr-o placă, particulele fagice eliberate prin liza celulelor inițial infectate sunt capabile de a infecta numai celulele vecine. Astfel, clarificarea (*clearing*) litică este limitată la o regiune circulară mică a pânzei. Acestă regiune este centrată pe prima celulă infectată (de fapt de virusul originar) și poartă denumirea de **plajă**. Plajele de liză sunt vizibile în pânza de cultură bacteriană de pe suprafața mediului agarizat. În timp ce se formează plajele, bacteriile neinfectate din restul suprafeței plăcii Petri se multiplică rapid, prin diviziune și produc fondul pânzei. (Fig. 60). Fiecare plajă de liză corespunde teoretic unui singur virus din suspensia inițială (amestec virus - bacterie). Numărul de plaje astfel format

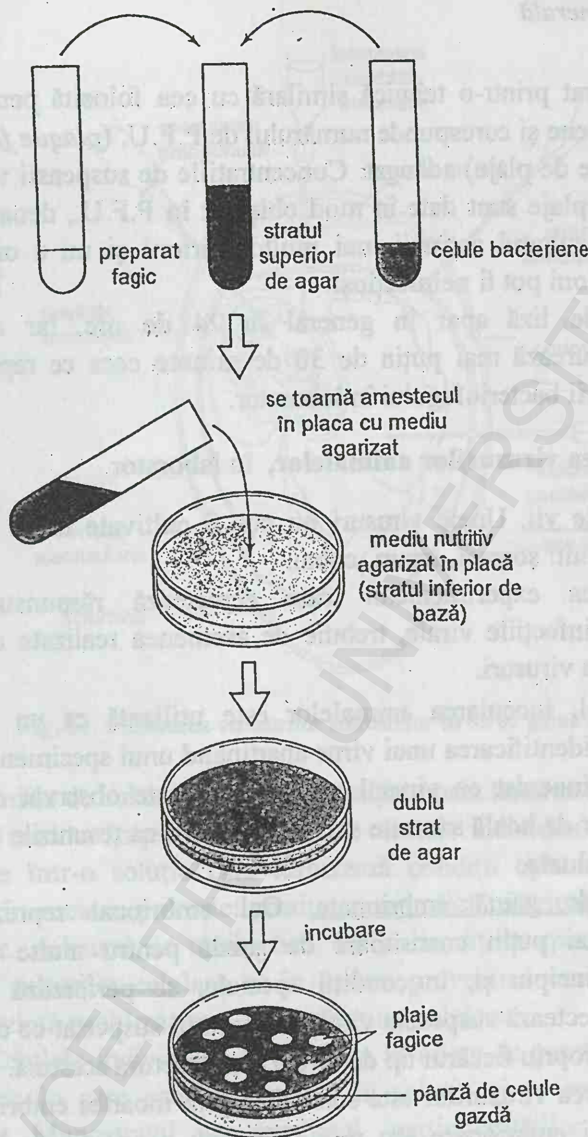


Fig. 60. Cuantificarea virusurilor bacteriilor prin metoda plajelor de liză utilizând tehnica dublului strat de agar. Într-o cantitate mică de agar se amestecă o suspensie diluată de preparat fagic cu celule bacteriene sensibile și amestecul se toarnă pe suprafața unei plăci cu agar nutritiv. Bacteriile gazdă, care au fost incorporate uniform în stratul superior de agar, încep să crească și după o incubare de 24 de ore formează o „pânză" de cultură. Fiecare particulă virală care se atașează de o celulă și este multiplicată poate determina liza celulei și particulele virale eliberate se răspândesc, infectând celulele adiacente, sunt multiplicate în acestea și din nou conduc la liză și eliberare. Dimensiunea plajei formate depinde de virus, gazdă și condițiile de cultivare.

poate fi înregistrat printr-o tehnică similară cu cea folosită pentru numărarea coloniilor bacteriene și corespunde numărului de P.F.U. (*plaque forming units* = unități formatoare de plaje) adăugat. Concentrațiile de suspensii virale măsurate prin numărul de plaje sunt date în mod obișnuit în P.F.U., deoarece o singură plajă poate fi rezultatul acțiunii mai multor virioni și nu a unuia singur și deoarece unii virioni pot fi neinfecțioși.

Plajele de liză apar în general în 24 de ore, iar ciclul litic al bacteriofagului durează mai puțin de 30 de minute ceea ce reprezintă un alt avantaj al cultivării bacteriofagului în laborator.

Cultivarea virusurilor animalelor, în laborator.

În animale vii. Unele virusuri nu pot fi cultivate decât în organisme animale vii, obișnuit: șoareci, iepuri, cobai.

Majoritatea experimentelor care cercetează răspunsul sistemului imunitar față de infecțiile virale, trebuie de asemenea realizate cu organisme întregi infectate cu virusuri.

În general, inocularea animalelor este utilizată ca un procedeu de diagnostic pentru identificarea unui virus aparținând unui specimen clinic. După ce animalul este inoculat cu virusul respectiv, el este observat din punct de vedere al semnelor de boală sau este sacrificat pentru ca țesuturile sale să poată fi examinate și evaluate.

În ouă de găină embrionate. Oul embrionat reprezintă forma convenabilă și mai puțin costisitoare de gazdă pentru multe virusuri ale animalelor. În principiu și, în condiții speciale, se perforează coaja oului embrionat și se injectează suspensia virală sau țesutul suspectat ce conține virus în locul adecvat (propriu fiecărui tip de virus) din structura acestuia. (Fig. 61).

Multiplicarea virusurilor este semnalată prin moartea embrionului, prin deteriorarea celulei embrionare sau prin formarea, pe membranele oului, de leziuni tipice. Această metodă a fost la un moment dat cea mai larg utilizată pentru cultivarea și izolarea virusurilor și încă este folosită pentru cultivarea virusurilor în vederea obținerii unor vaccinuri.

În culturi de celule. Pentru multe virusuri ale animalelor, culturile de celule au înlocuit ouăle embrionate ca medii de cultivare. Culturile de celule sunt reprezentate de celule animale dezvoltate pe medii de cultură în laborator.

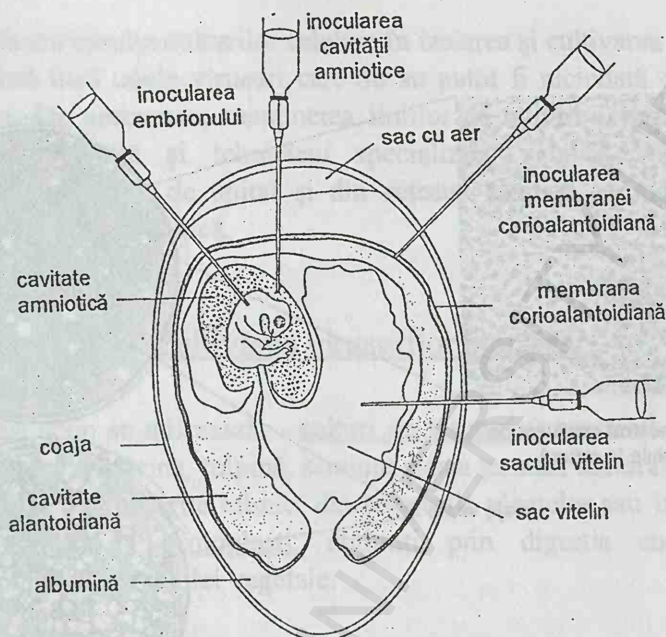


Fig. 61. Cultivarea virusurilor animalelor în ou de găină embrionat.

Liniile de culturi celulare sunt inițiate prin tratarea unei porțiuni de țesut animal cu enzime (tripsină) care separă celulele individuale. Aceste celule sunt suspendate într-o soluție care furnizează condiții optime pentru dezvoltarea celulelor, în ceea ce privește: presiunea osmotică, nutrienți, factori de creștere, antibiotice. Adausul de antibiotice, ca și condițiile speciale de lucru pentru obținerea culturilor celulare au în vedere prevenirea contaminării microbiene care reprezintă problema majoră a culturilor celulare.

Celulele individuale au tendința să adere de peretele vasului de sticlă sau plastic în care sunt suspendate în soluție și se reproduc formând un monostrat. Monostratul este rezultatul particularităților **celulelor normale**, particularități cunoscute ca **aderență** și **inhibiție de contact**. Virusurile care infectează un asemenea monostrat determină, pe măsură ce sunt multiplicate, alterări ale celulelor monostratului, cunoscute sub denumirea de **efect citopatic** (E.C.P.). Efectul citopatic poate fi stabilit prin observații microscopice și poate fi apreciat cantitativ, în unele situații, în mare parte la fel cu plajele determinate de bacteriofagi pe o pânză de bacterii (Fig. 62).

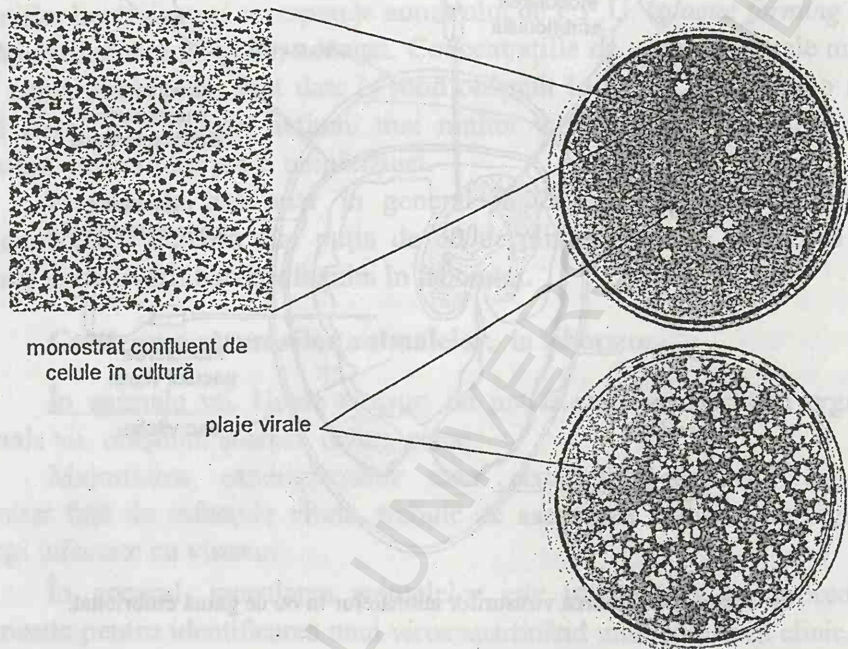


Fig. 62. Culturi de celule în monostrat obținut în plăci Petri. Se observă plajele de liză induse de virus și pe microfotografie monostratul confluent.

Liniile celulare primare, derivate din porțiuni de țesut, au tendința de a muri numai după câteva generații. Anumite linii celulare inițiate din embrioni umani pot fi menținute aproximativ o sută de generații și sunt utilizate pentru diagnosticul bolilor umane. Liniile celulare dezvoltate din celule umane embrionare sunt utilizate pentru cultivarea virusului rabic, de exemplu, în vederea obținerii vaccinului antirabic.

Pentru cultivarea curentă a virusurilor în laborator sunt utilizate culturile celulare continue, constituite din **celule transformate** care pot fi menținute un număr indefinit de generații (linii celulare „imortalizate"). Una dintre ele, de exemplu, linia celulară HeLa a fost izolată dintr-un cancer de col uterin al unei femei care a murit în 1951. După ani de cultivare în laborator multe asemenea linii celulare și-au pierdut aproape cu totul caracteristicile originare ale celulei, însă aceste modificări nu interferă cu utilizarea celulelor pentru propagarea virusurilor.

În ciuda succesului culturilor celulare în izolarea și cultivarea virusurilor în general, există încă unele virusuri care nu au putut fi niciodată cultivate în culturi celulare. De asemenea, menținerea liniilor de culturi celulare necesită experiență considerabilă și tehnicieni specializați, condiții care fac ca majoritatea laboratoarelor de spital și din rețeaua sanitară să nu izoleze și identifice încă virusuri în clinică.

Cultivarea virusurilor plantelor

În acest scop se utilizează: - culturi de țesuturi (provenind din diferite porțiuni ale plantei: rădăcină, tulpină, semințe și/sau țesuturi tumorale); - culturi de celule (izolate prin diferite tehnici din țesuturile plantelor sau izolate de la insecte); - culturi de protoplaști; obținuți prin digestia enzimatică a componentelor peretelui celulei vegetale.

Identificarea virusurilor

Identificarea noilor izolate de virus este o problemă de mare dificultate. Pe lângă faptul că virusurile nu pot fi vizualizate decât la microscopul electronic, în accepțiunea actuală pentru a descrie cu cât mai mare exactitate un virus trebuie determinate aproximativ 500 - 1000 de caractere ale acestuia.

Metodele cele mai comun utilizate pentru indentificare sunt cele imunologice, bazate pe reacții serologice ale căror baze moleculare sunt în prezent bine stabilite. Prin asemenea teste, virusul (ca antigen) este detectat și identificat după reacția sa cu anticorpii. Anticorpii (ca reactant imunologic) care sunt proteine (imunoglobuluine) produse de organismul animal ca răspuns la expunerea acestuia la un virus, sunt înalt specifici pentru virusul care a determinat formarea lor.

Alte căi utilizate curent pentru identificarea virusurilor implică observarea efectelor lor asupra celulelor gazdă: modificările morfologice și biochimice care sunt caracteristice diferitelor tipuri de virusuri.

În cursul etapelor proceselor de identificare și chiar de diagnostic viral, se utilizează și metodele de secvențializare parțială sau totală a

genomului virusurilor purificate. Pentru virusurile prototip există baze de date accesibile, cu secvenţe de genom disponibile pentru comparare. Aceste metode de cercetare în laborator nu sunt totuşi practice pentru identificarea de rutină a probelor clinice.

Multiplicarea virusurilor. Relaţii virus - celulă gazdă

Multiplicarea virusurilor realizată exclusiv în celula gazdă, reflectă relaţia virus - celulă gazdă şi poate evolua diversificat. Cel mai mult studiat sistem virus - celulă gazdă şi ca atare cel mai bine cunoscut la nivel molecular este sistemul bacteriofag - celulă bacteriană.

În relaţia fag - celulă bacteriană se disting două modalităţi principale de evoluţie, corespunzând la două tipuri de fagi caracteristici:

1) Fag virulent - celulă sensibilă, cu realizarea **ciclului litic** consecutiv replicării fagului în celula gazdă (permisivă) şi, în final, liza acesteia. Ciclul litic este caracteristic fagilor din seria T par: prototip T4.

2) Fag temperat - celulă sensibilă, cu realizarea **ciclului litic** pe de o parte şi cu **evoluţie lizogenă**, pe de altă parte caracteristică fagului λ (lambda). Evoluţia lizogenă presupune integrarea genomului fagului în cromozomul celulei bacteriene, în stare de profag, tolerat temporar de aceasta. O asemenea stare se numeşte lizogenie, iar fagii care o determină sunt numiţi lizogeni sau fagi temperaţi. Celulele gazdă participante sunt denumite celule (bacterii) lizogene.

Multiplicarea bacteriofagilor este în esenţă, ca mecanism şi principale etape, similară tuturor virusurilor. Datorită avantajelor legate de cultivarea bacteriofagului în laborator şi de durata mică a unui ciclu complet de replicare, multiplicarea virusurilor a fost descifrată pe sistemul bacteriofag-celulă gazdă.

1. <u>Ciclul litic.</u> Fagul T4-*Escherichia coli*

Pentru a înţelege evoluţia litică a replicării în celula gazdă este necesară cunoaşterea structurii complexe a fagului T4 care este specific pentru enterobacterii (Fig. 63). Simetria capsidei este binară: la nivelul capului, capsomerele sunt aşezate după o simetrie icozaedrică, iar la nivelul cozii, după o

simetrie helicală. Capul fagului este alungit, cu o configurație geometrică numită antiprismă pentagonală bipiramidală, de dimensiuni 111 x 78nm și constă din 152 capsomere (T=13). Coada este de 113 x 16nm și are un guler, o placă bazală, 6 cârlige sau croșete și 6 fibre lungi (130nm).

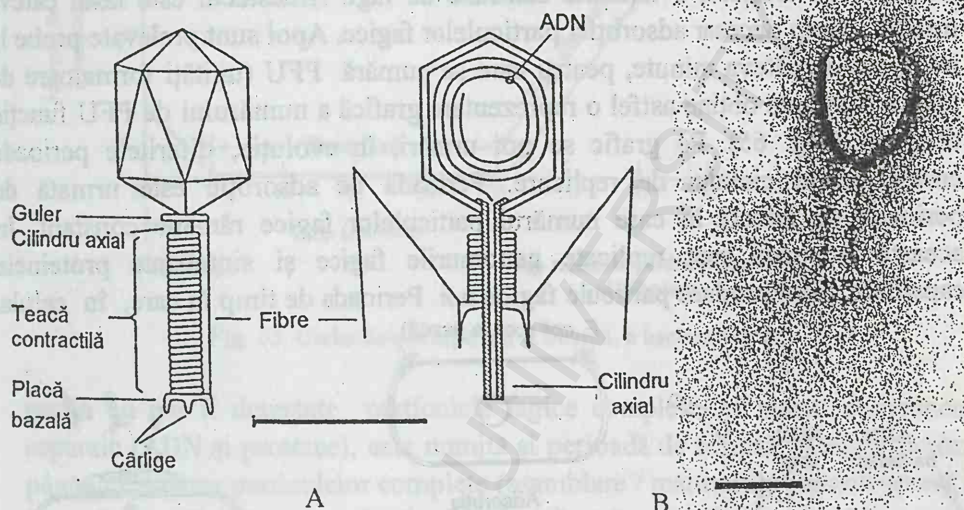


Fig. 63. A. Reprezentarea schematică a colifagului T4, la suprafață (coada extinsă) și în secțiune (coada contractată). B. Microelectronografie în contrast negativ. Barele reprezintă 100 nm.

În interiorul capului se găsește genomul fagic, o moleculă de ADNdc, care conține 5-hidroximetilcitosină în loc de timină, are un conținut G + C de 35% și este glicosilat, permutat circular și cu redundanță terminală. Genomul este împachetat strâns și include 150-160 de gene. Pe lângă genom, interiorul capului conține și 3 tipuri de proteine. Teaca cozii este contractilă, alcătuită din 144 capsomere dispuse pe 24 rânduri. Prin contracția acesteia se eliberează cilindrul axial, ceea ce permite perforarea peretelui celular bacterian. Prin lumenul canalicular al cilindrului axial, ADN fagic este transferat în celula bacteriană în cursul infecției.

Ciclul litic reprezintă secvența de evenimente cuprinsă între infecția unei celule sensibile de către un fag și liza ulterioară a acesteia cu eliberarea particulelor fagice progene („fiice") (Fig. 64). Se poate considera că evoluția ciclului litic are loc în 4 faze principale: adsorbția fagului la celula gazdă;

pătrunderea (injectarea) acidului nucleic fagic; evenimentele intracelulare și liza. Diferitele stadii implicate în multiplicarea bacteriofagilor pot fi demonstrate în condiții experimentale care permit obținerea unei curbe de evoluție a bacteriofagului, cu o treaptă (*one-step growth experiment*). În acest scop se adaugă unei suspensii de celule bacteriene (gazdă) aflate în fază logaritmică timpurie de creștere, o anumită cantitate de fagi. Amestecul este lăsat câteva minute - timp necesar adsorbției particulelor fagice. Apoi sunt prelevate probe la intervale de câteva minute, pentru care se numără PFU (unități formatoare de plaje). Se poate obține astfel o reprezentare grafică a numărului de PFU funcție de timp (Fig. 65). Pe grafic se pot urmări, în evoluție, diferitele perioade corespunzând ciclului de replicare. Perioada de adsorbție este urmată de perioada de latență în care numărul particulelor fagice rămâne constant. In această perioadă sunt replicate genomurile fagice și sintetizate proteinele capsidale, fiind produse particule fagice noi. Perioada de timp în care, în celula

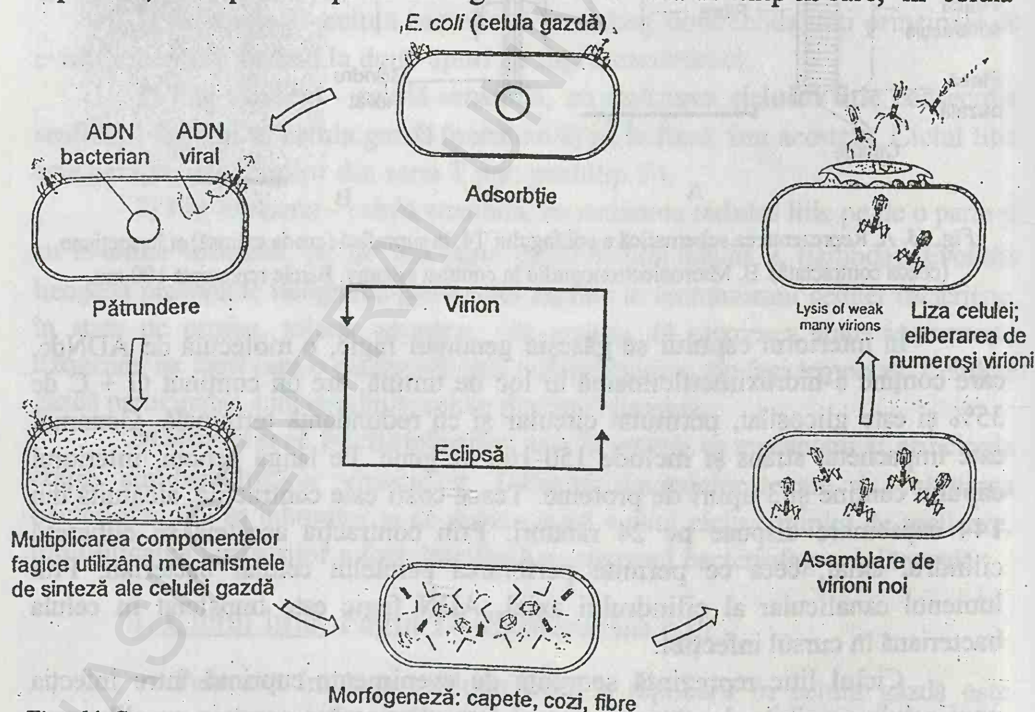


Fig. 64. Secvența de evenimente din ciclul de multiplicare a bacteriofagilor T-par. Ciclul este divizat în faza de eclipsă (în care fagul evoluează dar nu este infecțios) și faza de virion (când virusul este matur și capabil de a infecta o gazdă). (Textul furnizează detalii ale acestui ciclu).

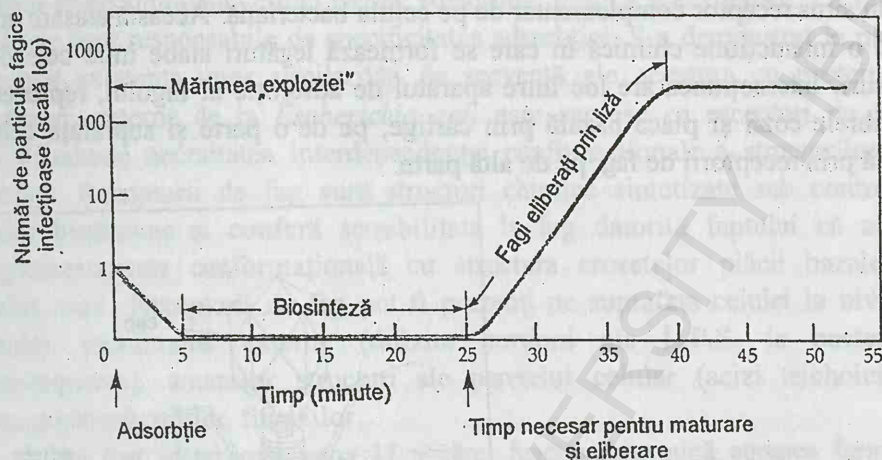


Fig. 65. Curba de evoluție într-o treaptă, a bacteriofagului.

gazdă nu pot fi detectate particulele fagice complete, ci numai componente separate (ADN și proteine), este numită și perioadă de eclipsă. Aceasta durează până la formarea particulelor complete (asamblare / maturare). Celulele gazdă se lizează pe măsură ce producția lor fagică este completă și astfel numărul particulelor fagice formatoare de plaje crește (porțiunea ascendentă a curbei) până când toate celulele bacteriene au fost lizate și numărul particulelor fagice atinge un platou sau treaptă, de unde numele acestui experiment. Numărul particulelor fagice infectante rămânând constant, indică faptul că ulterior nu mai are loc multiplicarea fagică.

Din grafic se pot stabili: durata diferitelor perioade și numărul de particule eliberat pe celula infectată. Infecția fiind explozivă durata de timp de la adsorbția fagului la eliberare se numește timp de explozie și este cuprins între 20 și 40 minute. Numărul particulelor fagice nou sintetizate, eliberate de o singură celulă se apreciază ca mărime a exploziei și în mod obișnuit poate fi de 50-200.

Analiza principalelor etape ale infecției litice

Adsorbția. Infecția celulei bacteriene este precedată de o serie de ciocniri întâmplătoare între particulele fagice și celula bacteriană. Consecința este adsorbția cu o fază inițială reversibilă și o fază ulterioară ireversibilă

(Fig. 66) . În cursul acestui proces un situs de adsorbție de pe virus se atașează de un situs receptor complementar de pe celula bacteriană. Această atașare are la bază o interacțiune chimică în care se formează legături slabe între cele două situsuri. Interacțiunea are loc între aparatul de adsorbție al fagului, reprezentat de fibrele cozii și placa bazală prin cârlige, pe de o parte și suprafața celulei gazdă prin receptorii de fag, pe de altă parte.

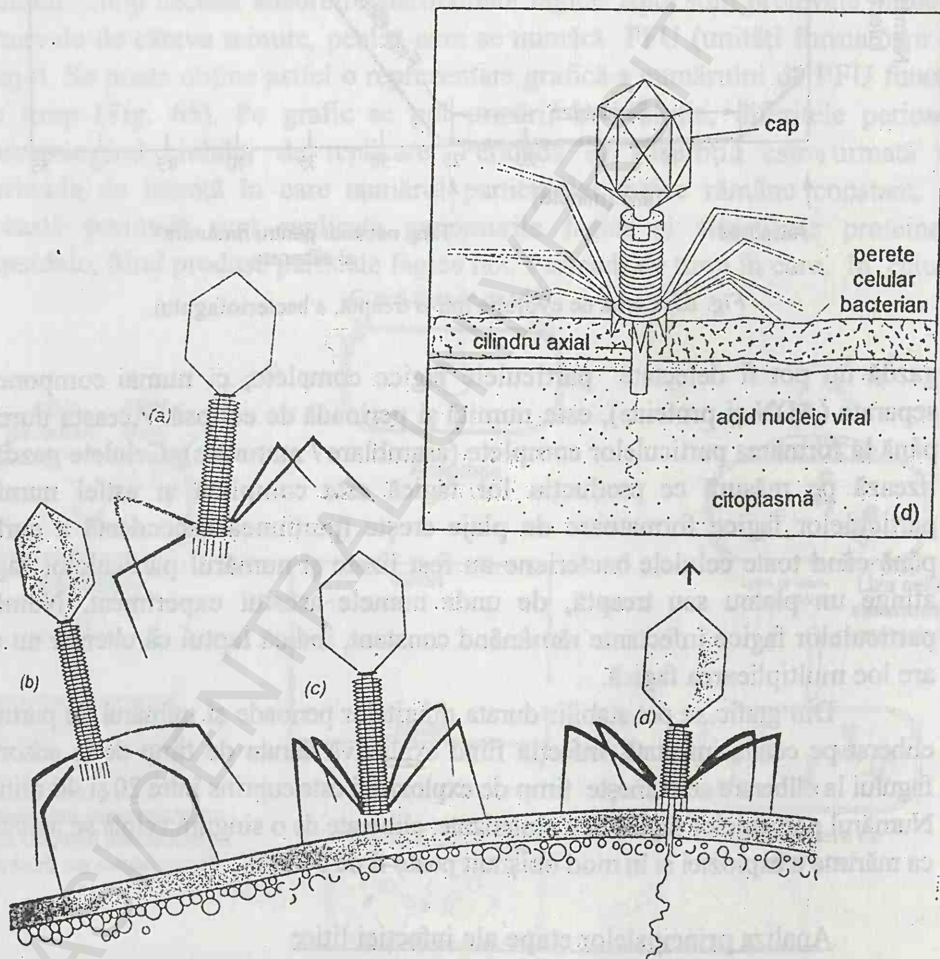


Fig. 66. Adsorbția sau atașarea particulei fagului T4 de peretele celular al *Escherichiei coli* și injectarea ADN; (a) Particula neatașată. (b) Atașarea de perete prin fibrele cozii. (c) Fixarea cârligelor plăcii bazale a cozii pe suprafața (receptori) peretelui celular. (d) Contracția tecii cozii și injectarea ADN.

Fibrele cozii, fixate pe suprafața inferioară a gulerului se desprind atașându-se de suprafața celulei gazdă. Adsorbția implică specificitate. La fagul T4 fibrele sunt responsabile de specificitatea adsorbției. S-a demonstrat la nivel molecular existența unor similarități de secvență ale acestora cu proteinele membranei externe de la *Escherichia coli* care servesc ca receptori de fag, confirmându-se necesitatea interdependenței conformaționale a structurilor de suprafață. Receptorii de fag sunt structuri chimice sintetizate sub controlul genelor bacteriene și conferă sensibilitate la fag datorită faptului că au o complementaritate conformațională cu structura croșetelor plăcii bazale și fibrelor cozii. Receptorii de fag pot fi prezenți pe suprafața celulei la nivelul capsulei, membranei externe (diferite porțiuni ale L.P.S. la bacteriile Gram-negative), anumitor structuri ale peretelui celular (acizi teichoici la Gram-pozitive), pililor, flagelilor.

Au fost identificate gena 11 a cărei funcție determină atașarea fermă a croșetelor și gena 12 care facilitează contracția ulterioară a tecii cozii. Mecanismul de adsorbție este diferit în funcție de tipul de fag. Pentru adsorbție sunt necesari anumiți factori de mediu (cationi, temperatură și alții). În mediile naturale (ca apa de canal), în care cei doi parteneri ai relației (fagii și gazdele lor potențiale) sunt constant prezenți, se manifestă o evoluție rapidă și complementară între proteinele fagice utilizate ca receptori, pe de o parte și situsurile celulare de adsorbție, pe de altă parte. Utilizarea unor structuri imuabile (care nu pot fi modificate prin mutație fără pierderea viabilității) ar duce la eliminarea bacteriilor prin infecția litică și în cele din urmă și a fagului implicat.

Penetrarea celulei sau pătrunderea (injectarea) genomului viral în interiorul acesteia reprezintă evenimentul crucial în infecția virală.

Structura particulei fagice se comportă ca o microseringă în care cilindrul axial este acul ce perforează peretele celular și injectează genomul viral în citoplasmă. Structura lineară a genomului reprezintă o adaptare perfectă. Odată cu genomul viral pătrund și o serie de proteine din interiorul capului, în timp ce capsida rămâne în întregime la exterior. Învelișul proteic are numai funcția de a ghida genomul viral către celulă. Experimentele care au demonstrat că în celula bacteriană pătrunde numai informația genetică (celelalte structuri rămânând la exterior), au reprezentat un argument fundamental pentru demonstrarea rolului acizilor nucleici în ereditate. S-a demonstrat astfel că numai informația genetică fagică poartă în structura sa capacitatea de a infecta o

celulă bacteriană, de a introduce o nouă ordine în această celulă și a asigura propria replicare ca și sinteza constituenților proteici, respectiv morfogeneza ansamblului structural atât de complex.

Pentru diferitele tipuri de bacteriofagi se presupune că există diferite mecanisme de injectare a genomului în celulă. În cazul fagului T4, se știe cu certitudine că se realizează prin contracția cozii care permite descoperirea cilindrului axial astfel încât acesta poate perfora peretele celular (Fig. 66 d).

Se cunosc puține detalii asupra mecanismului molecular al injectării genomului fagic. Luând în considerație durata reală a acestei etape, molecula de ADN trebuie să se deplaseze cu o viteză de cel puțin 3 kb/secundă printr-un cilindru axial cu diametrul de 2,5 nm. S-a sugerat că sunt implicate sisteme moleculare analoge cu cele care intervin în replicarea ADN.

Genomul fagic este dirijat spre interiorul celulei bacteriene cu ajutorul unor proteine - pilot. Nu este bine cunoscut rolul celulei bacteriene în acest proces. După unii autori ar fi pasiv, după alții ar fi de aspirație - similar celui constatat prin studii pe bacterii în curs de conjugare în care celula receptor se comportă ca și cum ar aspira cromozomul celulei donator.

Genomul viral liber în citoplasmă se numește fag vegetativ (de unde și formularea replicare vegetativă).

Evenimentele evoluției intracelulare

Evoluția intracelulară, corespunzând perioadei de latență a ciclului litic este etapa în care se manifestă comportarea definitorie a fagului: întreaga activitate metabolică a celulei bacteriene, care a fost infectată de o singură moleculă de acid nucleic este supusă fabricării și împachetării a 200 sau posibil mai multe copii ale moleculei invadante, într-o perioadă de timp necesară pentru o singură diviziune celulară normală. În realizarea acestui proces, dependența fagilor de funcțiile gazdei este în mare parte corelată cu propria lor dimensiune: fagii mari (cum este T4) cu peste 150 gene pot codifica un spectru de enzime și proteine structurale; fagii mici cu acid nucleic monocatenar au numai 4 activități genice.

Observația fundamentală realizată cu ajutorul fagilor Tpar este aceea că infectarea bacteriei (prin injectarea genomului viral) determină o rearanjare profundă a tuturor sintezelor macromoleculare în celula gazdă. Pe de o parte încetează sinteza macromoleculelor gazdei (direcționată de genomul celular), iar pe de altă parte are loc, în același timp, sinteza de macromolecule virale. Cu alte

cuvinte, sintezele celulare sunt în întregime înlocuite de sinteze virale. Acest *shift* metabolic reprezintă baza parazitismului (absolut) viral: substituirea genelor celulare cu cele virale în direcționarea mașinăriei de sinteză a celulei. Pentru fagii T4 *shift*-ul este determinat de numeroase proteine și enzime virale noi, care sunt sintetizate după infecție, ca urmare a exprimării genelor virale.

Exprimarea genelor este strict reglată pentru a se realiza o tranziție lină între sintezele celulară și virală, fără distrugerea bruscă a celulei.

Un aspect important al reglării este secvența ordonată în timp a exprimării genelor. Succesiunea reglată a funcțiilor fagice este determinată în principal la nivelul transcrierii (ADN fagic - ARNm viral).

Mecanismul de bază al reglării este apariția succesivă de noi transcriptaze (ARNpolimeraze dependente de ADN) care recunosc seturi diferite de promotori sau de secvențe terminus. Unele transcriptaze noi sunt specificate în întregime de gene virale, altele sunt generate prin modificarea transcriptazei gazdă (realizată enzimatic sau prin asociere cu proteine virale). Modificările de transcriere care apar într-un stadiu sunt realizate de produșii genelor fagice exprimate în stadiul anterior.

Pentru fagul T4, din punct de vedere al succesiunii transcrierii genelor fagice, există mai multe clase de gene: unele sunt transcrise înainte de a începe replicarea ADN fagic; altele continuă să fie transcrise în cursul infecției și altele sunt transcrise după inițierea replicării ADN (Fig. 67). Astfel: - **genele timpurii** sunt transcrise de ARN polimeraza gazdei înainte de a începe replicarea ADN. Ele codifică **proteinele timpurii** care dereglează sinteza macromoleculelor celulei și participă la replicarea ADN fagic;- **genele mijlocii** codifică produșii necesari pentru **replicarea ADN** și recombinare, dar spre deosebire de genele timpurii continuă să fie transcrise în cursul infecției. Transcrierea lor începe la promotori speciali și necesită proteine specificate de fag care interacționează cu ARN-polimeraza gazdei; - **genele tardive** sunt transcrise după ce a început replicarea ADN, de transcriptaza gazdei în asociere cu alte proteine specificate de fag. Aceste gene codifică **proteinele tardive**.

Exprimarea succesivă a acestor clase de gene determină desfășurarea evenimentelor intracelulare în trei faze principale:

1. Sinteza (transcrierea și traducerea) proteinelor timpurii;
2. Replicarea genomului fagic;
3. Sinteza (transcrierea și traducerea) proteinelor tardive.

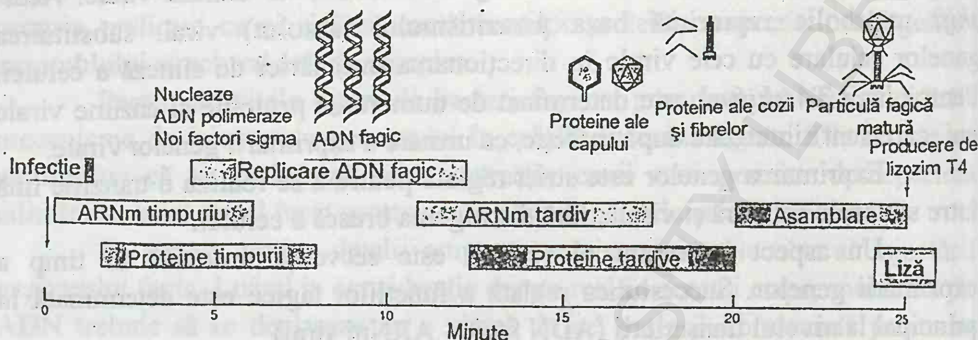


Fig. 67. Succesiunea în timp a evenimentelor în infecția cu fagul T4. După injectarea ADN, se formează prin transcriere ARNm timpuriu și mijlociu, necesari pentru traducerea la nucleaze, ADN polimeraze și diferite alte proteine implicate în replicarea ADN. ARNm tardiv este tradus în proteine structurale ale virionului fagic și lizozim T4, necesar pentru liza celulei și eliberarea noilor particule fagice.

1. Principale <u>categorii de proteine timpurii</u> sunt următoarele:

- **proteinele de membrană**, care au rolul de a astupa golurile rezultate prin perforarea peretelui celular de către bacteriofagi și astfel de a împiedica pierderea unor constituenți celulari esențiali;

- **proteinele de dereglare** care perturbă metabolismul bacterian și degradează enzimatic cromozomul bacterian. Sinteza macromoleculelor celulei gazdă este stopată de trei tipuri de proteine de dereglare: (1) unele proteine fagice afectează transcriptaza fagică făcând-o incapabilă să recunoască promotorii gazdei și, în consecință, modifică sinteza ARN gazdă; (2) unele determină inhibiția sintezei proteinelor gazdei: fagul T4 induce un represor de traducere, în timp ce alți fagi Tpar determină clivajul ARNt gazdă; (3) unele determină deplierea nucleoidului bacterian; ADN bacterian se atașează de membrana celulară unde este degradat, sub acțiunea endonucleazelor fagice și a exonucleazei, la molecule constitutive. Prin acest proces, constituenții cromozomului bacterian devin material de construcție pentru genomul fagic, ceea ce mărește potențialul de replicare a genomului fagic. Experimentele cu marcare demonstrează că aproximativ 1/3 din nucleotidele ADN fagic își au originea din ADN gazdă.

- **proteine - enzime** care asigură sinteza moleculelor neobișnuite din compoziția fagului și anormale pentru celula respectivă, cum este

5-hidroximetilcitosina caracteristică ADN fagic (T4). De aceea, 5-hidroximetil-citosina servește ca marker pentru a distinge în celula bacteriană fagul vegetativ de ADN bacterian.

- **proteine de reglare** care coordonează intrarea în acțiune a diferitelor gene și proporția de constituenți fagici sintetizați.

- **enzime care participă în replicarea genomului fagic.**

2. Replicarea ADN fagic are la bază și reflectă particularitățile structurale neobișnuite ale ADN al fagului T4 (conține în loc de citosină, 5-hidroximetilcitosină) și organizarea la nivel molecular a cromozomului reprezentat de o singură moleculă de ADN. Cromozomul este linear și per populație de particule fagice cromozomii lineari sunt neidentici ca succesiune a genelor. Fagii Tpar au o hartă genetică circulară, începutul fiecărui cromozom aflându-se la un punct aparent întâmplător al hărții (**permutare circulară**). În plus, fiecare cromozom are o secvență de ~ 1000 baze la un capăt, care este o repetare exactă a celei de la capătul celălalt (**redundanță terminală**).

La scurt timp după infecția celulei bacteriene cu T4, se observă în interiorul acesteia forme circulare de mărimea unui singur cromozom fagic. Aceasta denotă circularizarea cromozomului, al cărei substrat este reprezentat de regiunea redundantă terminală. Circularizarea este o necesitate pentru replicare. Molecula de ADN fagic se replică în două faze: în prima, crește cantitatea de ADN, iar în cealaltă sunt generate molecule mature. In prima fază replicarea ADN începe la o origine internă fixă și continuă bidirecțional și semiconservativ. Pe microelectronografii se observă originea replicării sub forma unei bucle în expansiune (Fig. 68). Moleculele de ADN foarte lungi, caracteristice fagilor Tpar au mai multe origini, astfel încât structura finală de replicare este complexă și poate conține până la 60 de furci de replicare. După mai multe runde de replicare, manierea de replicare se modifică intrând în a 2-a fază. Aceasta este caracterizată prin molecule gigant, numite concatemeri, generate prin procese de recombinare (rupere și reunire) (Fig. 69). Concatemerii lungi generați prin acest mecanism au numeroase puncte de ramificare și la microscopul electronic apar sub forma unor complexe de filamente încâlcite. La fagii Tpar recombinarea continuă să aibă loc, cu o mare frecvență, după formarea concatemerilor, conducând la dispersia ADN parental în numeroase molecule progene dintre care fiecare conține un segment parental mic, covalent linkat cu ADN nou sintetizat.

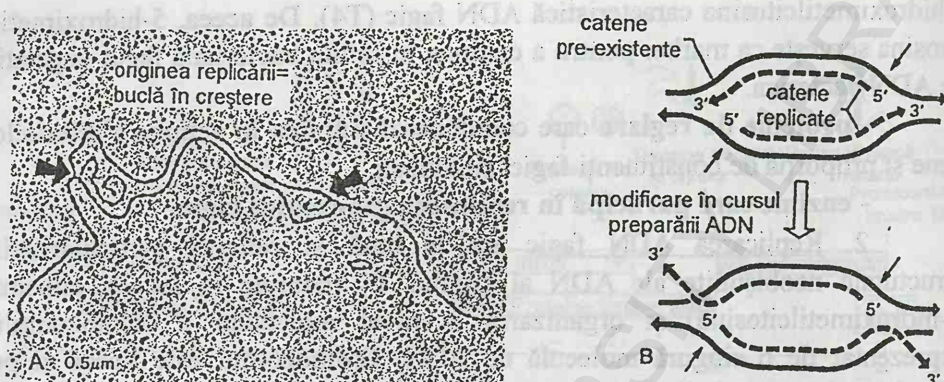


Fig. 68. Dovada replicării bidirecţionale a ADN-T4. Pe electromicrografia ADN parţial replicat (A) se observă o buclă de creştere simetrică, cu o „mustaţă" de ADNmc (săgeţi) care reprezintă capătul 3′ al fiecărei catene în creştere. După toate probabilităţile „mustaţa" este formată ca în B, deoarece la fiecare capăt al buclei, catena terminată 3′ creşte mai rapid decât capătul 5′ şi în cursul preparării ADN cele două catene parentale se rup în urma punctului unde replicarea este completă.

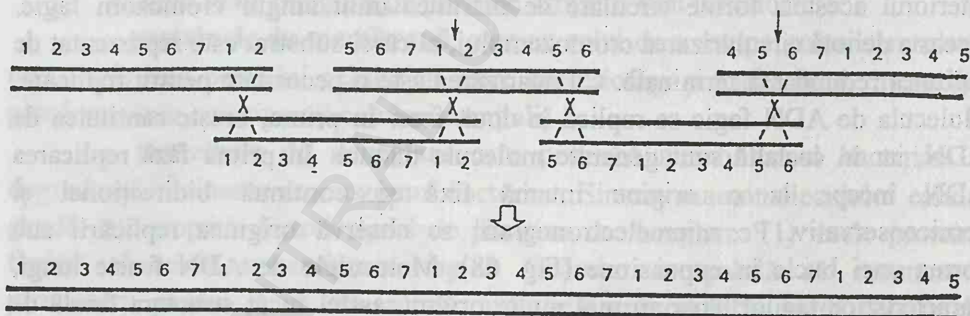


Fig. 69. Formarea concatemerului prin recombinare. Recombinarea genetică este determinată prin fenomene de *crossing-over* de tipul B, între molecule parentale diferite. Cele de tip A, între molecule identice, nu duc la recombinare. Cifrele indică în mod arbitrar succesiunea genelor. A se observa redundanţa terminală. Procese de *crossing-over* de tip B (săgeţi), între molecule parentale diferite, determină recombinarea genetică în timp ce cele de tip A, între molecule identice, nu. Numerele indică (arbitrar) gene.

Recombinarea este o treaptă esenţială în multiplicarea fagului T4 ca şi a altor fagi cu genom ADN liniar, deoarece procesul permite replicarea completă a genomurilor lor. La sfârşitul replicării concatemerii sunt tăiaţi în diverse moduri, pentru a genera molecule mature. (Fig. 70).

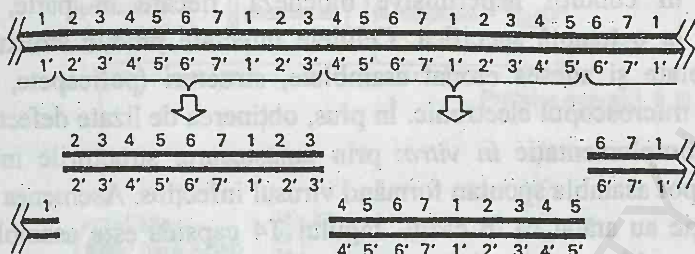


Fig. 70. Producerea de molecule mature de ADN viral din concatemeri: mecanismele care generează molecule permutate cu capete repetitive, ca la fagul T4. Din concatemer sunt tăiate sub acţiunea endonucleazelor fragmentate cu lungimi constante, indiferent de secvenţe. Secvenţele sunt indicate de cifre.

3. Biosinteza(transcrierea şi traducerea) proteinelor tardive implică în principal formarea a 3 categorii de proteine: proteine structurale(capsidale); proteine de morfogeneză(de mulaj, cofraj) şi proteine care asigură liza celulei bacteriene pentru eliberarea particulelor fagice nou formate.

Maturarea şi eliberarea particulelor fagice, reprezintă ultimele două din seria de evenimente cauzate de exprimarea genelor virale în celulele infectate (Fig. 64 şi 67). În etapa de maturare (morfogeneză sau asamblare), componentele fagice (capsidele şi ADN viral) sunt asamblate pentru a forma virionii infecţioşi (particule virale complete). În procesul de eliberare, virionii părăsesc celula infectată care suferă liza. Procesul de asamblare este dirijat de produşii anumitor gene virale într-o secvenţă *step-by-step* (Fig.71). Capetele şi cozile bacteriofagilor sunt asamblate separat din substanţe proteice. În cap este împachetat ADN fagic şi este ataşată coada. Pentru multe virusuri mai simple, acidul nucleic şi proteinele capsidei se asamblează spontan pentru a forma virioni, fără intervenţia altor produşi ai genelor fagice.

Asamblarea capsidei

Asamblarea bacteriofagului T4 este interesantă ca model de formare şi stabilizare a structurilor biologice care conţin numeroase componente proteice diferite. Procesul a fost elucidat utilizând mutaţii condiţionat letale ale genelor

fagice, care în condiții nepermisive blochează, fiecare în parte, procesul morfogenetic la o treaptă specifică. Celulele infectate produc structuri fagice parțial asamblate și adesea eronat asamblate, structuri (policapete, policozi) evidențiate la microscopul electronic. În plus, obținerea de lizate defective poate conduce la complementație *in vitro*: prin amestecare, structurile incomplete acumulate se pot asambla spontan formând virusul infecțios. Asemenea studii de complementație au arătat că în cazul fagului T4 capsida este asamblată pe 3 linii de subansamble, care produc, respectiv, capete, cozi și fibre. Asamblarea cap-coadă este inițiată pe stratul intern al membranei plasmatice, în legătură cu proteinele celulare. Structurile complete sintetizate pe cele 3 subansamble, se asamblează apoi spontan în capside. (Fig. 71)

Cea mai complicată morfogeneză este cea a capului. Capul este asamblat printr-o serie de trepte secvențiale în timpul cărora fiecare moleculă de proteină (cu excepția primeia) suferă o modificare conformațională pe măsură ce este asamblată, relevând astfel un situs de legare care este recunoscut de următoarea moleculă.

Asamblarea capsidei capului este precedată de formarea unui miez prin autoasamblarea proteinelor de cofraj. Proteinele capsidale, în special proteina majoră a capului, **p23**, se asamblează în jurul miezului, producând inițial un **precap I**, de formă rotundă (Fig. 71). Formarea **precapului II** (de formă colțuroasă și mărită) apare după ce moleculele proteinei principale capsidale **(p 23)** sunt scurtate la capătul aminoterminal (sub acțiunea unei proteine prezente în miez), pentru a stabiliza structura. Proteinele miezului sunt clivate de către proteaze, în fragmente mici, dintre care unele rămân în cap (ca peptide interne). Se formează astfel **precapul III** în interiorul căruia începe pătrunderea ADN fagic, care atunci când este completă, precapul III devine **cap matur**.

Aceste mecanisme permit asamblarea în ordine a numeroaselor componente, sintetizate în același timp, în aceeași celulă, pentru a produce o capsidă adecvată includerii genomului viral și pentru a furniza metode necesare capturării și reținerii ADN. Asemenea mecanisme trebuie să fie rezultatul unei lungi evoluții, în cursul căreia capacitatea componentelor principale de a forma o capsidă icosaedrică, prin autoasamblare, a fost pierdută în scopul permiterii adăugării altor structuri.

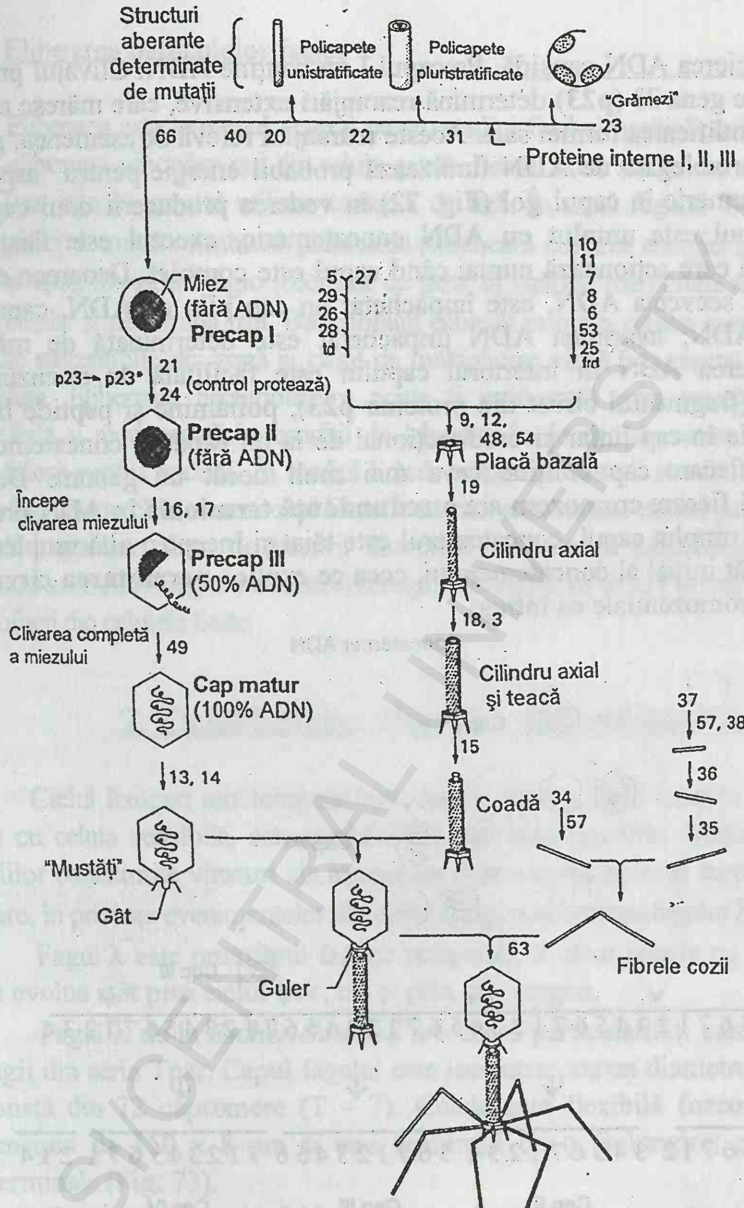


Fig. 71. Asamblarea virionilor T4 pe 3 subansamble majore: cap, coadă și fibre. Cifrele reprezintă genele care participă într-o anumită treaptă a procesului. *p23* = proteina specificată de gena 23. *p23** = produsul clivării *p23*. În situația în care o mutație împiedică funcționarea următoarelor gene pe linia de asamblare, se acumulează structuri aberante. „Grămezile" reprezintă mase dezorganizate de *p23*, acumulate la nivelul membranei plasmatice.

Asocierea ADN-capsidă. Precapul I nu conține ADN. Clivajul proteinei specificate de gena 23 (**p23**) determină rearanjări extensive, care măresc capul și determină modificarea formei sale. Aceste rearanjări relevă de asemenea, grupări chimice a căror legare de ADN furnizează probabil energie pentru "aspirarea" ADN concatemeric în capul gol (Fig. 72) în vederea producerii unui cap plin. După ce capul este umplut cu ADN concatemeric, excesul este tăiat de o endonuclează care acționează numai când capul este complet. Deoarece enzima nu recunoște secvența ADN, este împachetat un cap plin de ADN, capul este umplut cu ADN; lungimea ADN împachetat este determinată de mărimea capsidei. Plierea ADN în interiorul capului este facilitată de o enzimă de împachetare (fragmentul clivat din proteina **p23**), poliamine și peptide bazice. ADN pătrunde în cap liniar și unidirecțional de la un capăt al concatemerului, astfel încât fiecare cap conține ceva mai mult decât un genom. De aici constatarea că fiecare cromozom are o **redundanță terminală** în ADN propriu. Odată ce este umplut capul, concatemerul este tăiat și începe o altă umplere, de la un nou capăt inițial al concatemerului, ceea ce explică **permutarea circulară** a populației cromozomiale ca întreg.

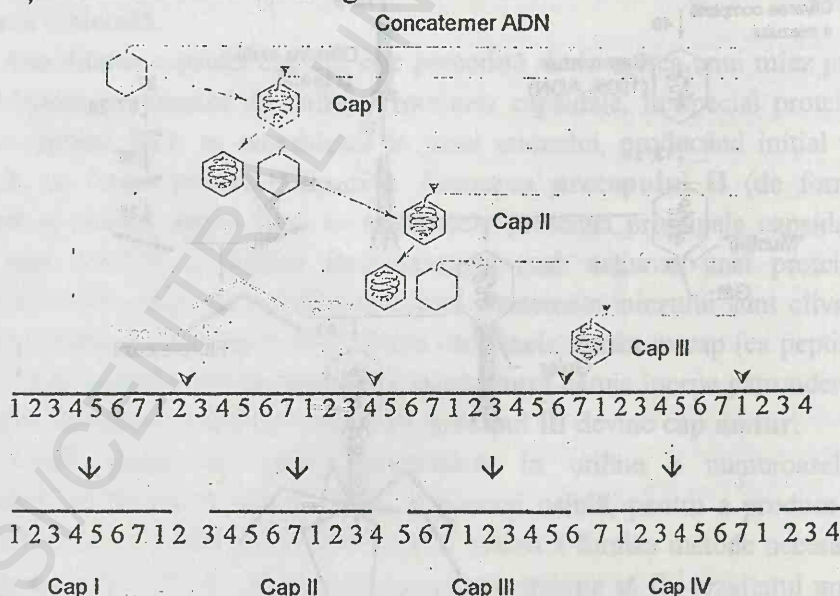


Fig. 72. Împachetarea unui ADN fagic dintr-un concatemer. Cifrele de la 1 la 7 inclusiv, reprezintă un genom complet. Precapetele sunt umplute cu ADNdc dintr-un concatemer. După umplerea unui cap, ADN rămas este clivat (⩔) și continuă să umple precapetele ulterioare. Fiecare cap al fagului T4 conține un genom complet plus o redundanță terminală (= 1, 2 pentru primul cap). De notat că umplerea fiecărui cap ulterior începe la un punct diferit al genomului, ceea ce duce la o serie de capete pline care sunt permutări circulare ale secvenței 1-7.

Eliberarea particulelor fagice

Eliberarea este termenul general pentru stadiul final al multiplicării virale și se referă la eliberarea virionilor noi din celula gazdă. Pentru acest stadiu din multiplicarea fagului Tpar este în general utilizat termenul de **liză**. În cazul fagului T4, mai mulți produși genici alterează membrana plasmatică (blochează cuplarea energiei în membrana internă) și apoi, lizozimul fagic (codificat de gena e) străbate membrana alterată, atacă peretele celular și determină liza. Bacteriofagii eliberați prin liza celulei gazdă infectează alte celule susceptibile din zonă și ciclul de multiplicare virală este repetat în interiorul altor celule. Eliberarea bacteriofagilor poate fi evidențiată prin caracterul de liză transmisibilă și recunoscută în condiții de laborator în funcție de natura mediului de cultură folosit pentru bacterii. În mediul lichid, cultura de bacterii sensibile infectate cu bacteriofagi devine clară, constituind lizatul bacterian care conține numai particule fagice. Pe mediul agarizat pânza de bacterii dezvoltate în prezența bacteriofagilor prezintă numeroase zone clare (regiuni circulare) corespunzând plajelor de liză în care sunt eliberați bacteriofagii din celulele lizate.

2. Ciclul lizogen. Fagul λ - *Escherichia coli*

Ciclul lizogen sau temperat este descris pentru fagul lambda deoarece, în relație cu celula sensibilă, este modelul cel mai bine descifrat. Multe aspecte ale infecțiilor cu anumite virusuri ale animalelor (virusuri tumorale și herpesvirus) sunt similare, în privința evenimentelor din ciclul lizogen al bacteriofagului λ.

Fagul λ este prototipul fagilor temperați, a căror relație cu celula gazdă poate evolua atât prin ciclul litic, cât și prin cel lizogen.

Fagul λ de la *Escherichia coli* are unele particularități care-l deosebesc de fagii din seria Tpar. Capul fagului este isometric, cu un diametru de ~ 60 nm și constă din 72 capsomere (T = 7). Coada este flexibilă (necontractilă), cu dimensiuni de 150 x 8 nm și este terminată cu o prelungire; prezintă fibre subterminale (Fig. 73).

Genomul are ~ 48,5 kbp (~50 gene) și este reprezentat de o moleculă ADNdc liniară cu extremități 5′ coezive (cos), alcătuite din 12 baze. Pentru aceste regiuni monocatenare, secvența bazelor este complementară, permițând circularizarea cromozomului ca o primă necesitate a replicării.

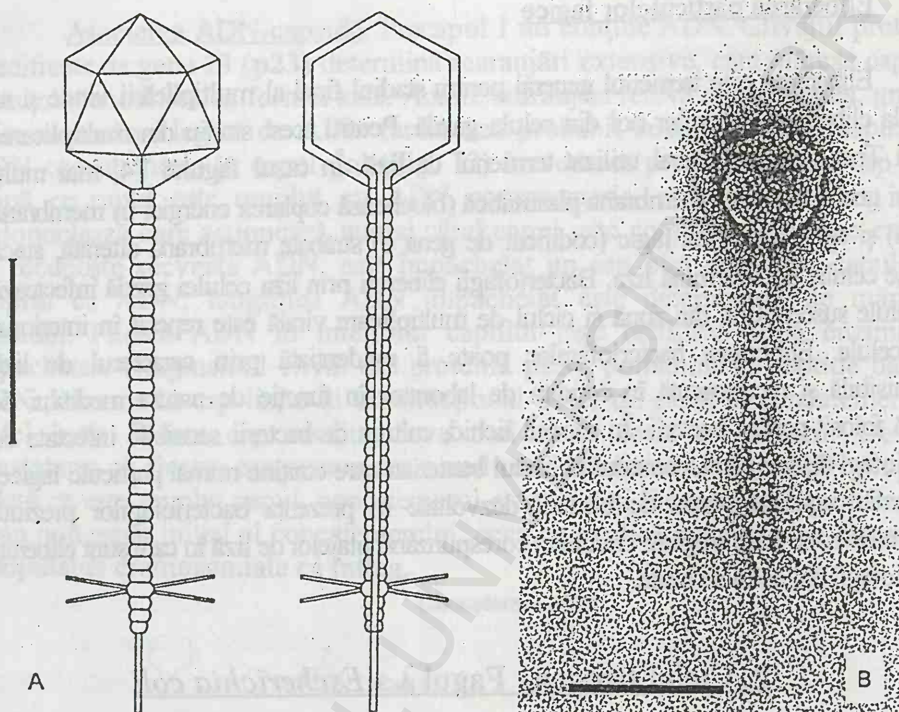


Fig. 73. A. Reprezentare schematică a colifagului λ, la suprafață (stânga) și în secțiune (dreapta). B. Microelectronografie în contrast negativ. Barele reprezintă 100 nm.

Ca organizare, cromozomii fagici liniari, sunt identici unul cu celălalt la fagii dintr-o populație; nu există permutare circulară și nici redundanță terminală (clivarea concatemerului ADN, după introducerea în cap are loc întotdeauna la situsuri specifice, sub acțiunea terminazei codificată de fag).

Fagii sunt adsorbiți la nivelul peretelui celular și inițiază infecția temperată odată cu injectarea ADNdc liniar. ADN infectant (pătruns în celulă) se circularizează și se integrează în genomul gazdei, la situsuri specifice (ciclul de lizogenie) sau este implicat direct, fără integrare, în replicare și transcriere (ciclul litic).

În ciclul litic are loc replicarea bidirecțională a ADN, urmată de replicarea unidirecțională după modelul cercului rotativ. Nu are loc degradarea ADN gazdă. Capetele și cozile sunt asamblate pe două căi separate. În lizate apar frecvent precapete. În ciclul lizogen ADN viral este integrat în cromozomul

celulei gazdă sub formă de profag și în acest caz nu sunt produse particule virale progene, iar celulele gazdă devin bacterii lizogene (Fig. 74). În anumite condiții, profagul este excizat din cromozomul bacterian și evoluează pe calea ciclului litic cu producere de particule fagice complete și liza celulei. De aceea fenomenul se numește lizogenie, respectiv capacitatea de a produce liză fără intervenția unei alte infecții fagice de la exterior.

Decizia în evoluția spre calea care conduce la lizogenie sau pe cea care duce la replicare completă (ciclul litic) este luată pe măsură ce începe sinteza proteinelor timpurii. Alegerea depinde de balanța dintre două proteine: represorul codificat de gena *cI* și antagonistul represorului, produs al genei *cro* (Fig. 75). Dacă predomină cantitativ represorul este blocată transcrierea altor gene timpurii și se instalează lizogenia. Transcrierea este inhibată prin legarea represorului de situsul operator O_R, care controlează (prin regiunea O_{R2}) sinteza proteinelor timpurii. Dacă produsul genei *cro* împiedică sinteza de represor în cantitate suficientă, rezultă replicarea virală și liza celulei gazdă. Deci punctul crucial în lizogenie este legarea represorului *CI* sau a proteinei C*ro* la situsul O_R.

Următoarea treaptă importantă în ciclul lizogen este **integrarea ADN** viral în ADN celular. Acest proces are loc prin atașarea unor regiuni specifice de pe ADN λ de regiuni omologe de pe ADN al *Escherichia coli* și integrarea (ruperea și reunirea) celor două molecule ADN sub acțiunea unei enzime de recombinare, codificate de fag. ADN viral integrat devine **profag.** Majoritatea fagilor lizogeni se integrează în cromozomul bacterian la unul sau câteva situsuri specifice, dar unii, cum este fagul Mu (mutativ) își pot integra ADN la numeroase situsuri și, alții, ca fagul P1 nu se integrează niciodată cu adevărat, ci rămân într-o stare temperată extracromozomală similar unei plasmide.

Starea de lizogenie, caracteristică fagului λ, este definită ca un tip de interacțiune între un bacteriofag temperat și o celulă bacteriană, care are la bază: represia genelor timpurii și integrarea genomului fagic în structura cromozomului celulei bacteriene la nivelul unor situsuri specifice.

Deoarece ADN viral integrat este replicat odată cu ADN celular, fiecare celulă, rezultată prin diviziune ulterioară, moștenește o copie a sa.

Pentru fagul λ, s-a demonstrat că integrarea genomului său în cromozomul *E.coli* se face între genele *gal* (pentru utilizarea galactozei) și *bio* (pentru sinteza biotinei).

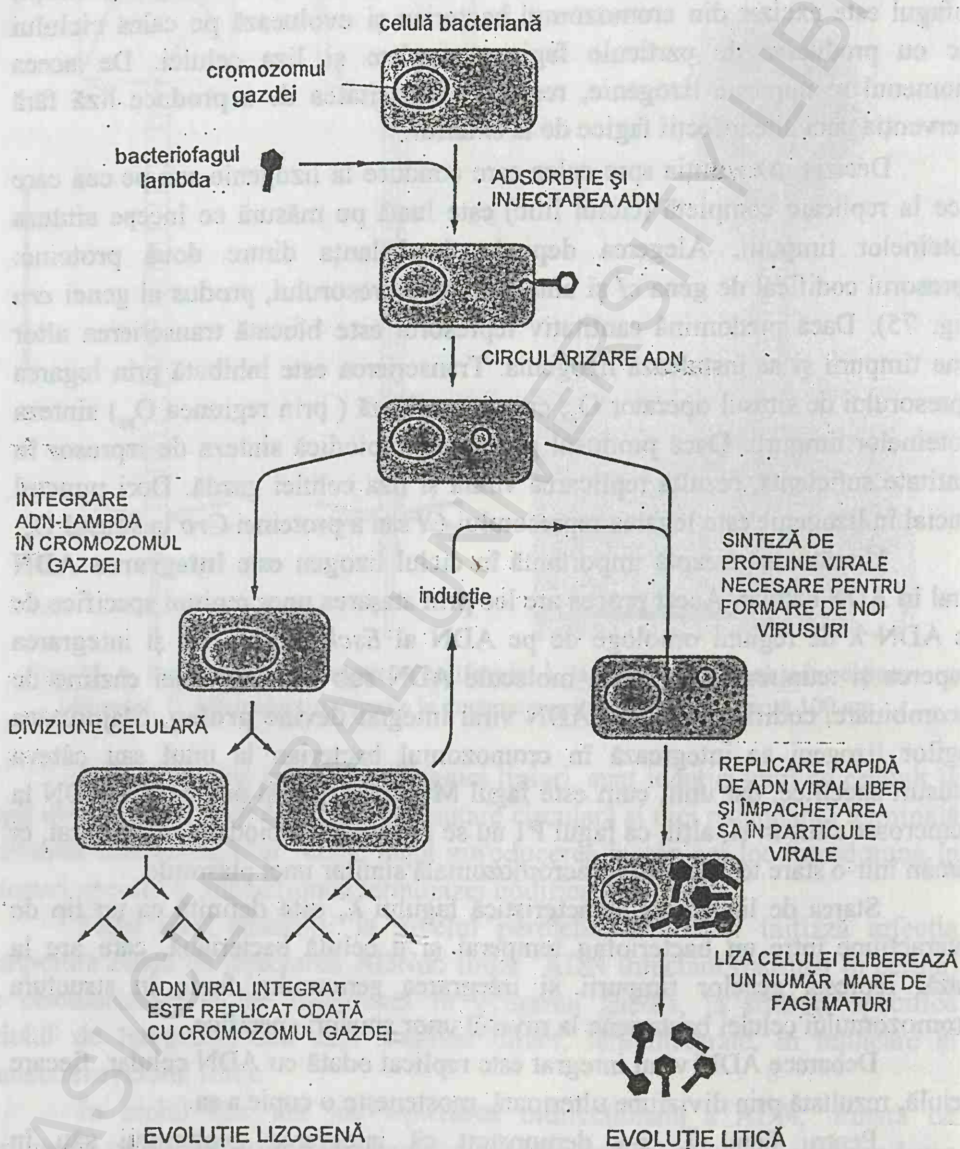


Fig. 74. Ciclul de existență a bacteriofagului lambda.

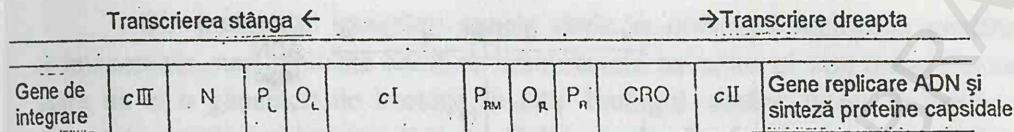


Fig. 75. Reprezentare schematică a regiunii ADN-λ, implicată în controlul lizogeniei. La scurt timp după infecţie, începe transcrierea genelor CRO şi N. Proteina N este un antiterminator care permite transcrierea genelor cII şi cIII şi a genelor de la dreapta lui cII şi de la stânga lui cIII. Proteina cII amplifică producerea proteinei represor. cI are două funcţii importante: 1) inhibă transcrierea la P_R O_R şi la P_L O_L, prin aceasta împiedicând replicarea fagului; şi 2) este un reglator pozitiv al propriei sinteze prin legarea P_{RM}. N, gena antiterminator; cI, gena represor; cII şi cIII, gene care influenţează produsul cI; P_L O_L, promotor şi operator stânga (*left*); P_R O_R, promotor şi operator dreapta (*right*); P_{RM}, promotor pentru menţinerea represorului; CRO, genă cu acţiune antagonistă represorului cI.

Mecanismul molecular al integrării , care are la bază un proces de *crossing-over* între o regiune ADN profag şi o regiune a cromozomului bacterian, este cunoscut şi explicat prin **modelul Campbell de integrare.** (Fig.76 a, b, c)

Integrarea genomului fagic în structura cromozomului bacterian este în primul rând rezultatul faptului că atât cromozomul bacterian cât şi genomul fagic au în structura lor nişte situsuri speciale de ataşare, notate convenţional cu *att* (*attachment*). Aceste regiuni sunt formate din 3 secţiuni: una centrală, notată cu litera *O* (de omologie), alcătuită din 15 baze şi, două care delimitează porţiunea O, notate cu B şi B′ pentru bacterii şi P, P' în cazul situsului de legare de la fag. Legarea genomului fagic de genomul bacterian se realizează la aceste situsuri, din care rezultă situsuri hibride. În procesul integrării are loc o permutare a ordinei genelor virale. În cursul integrării genomului fagic nu se pierd gene cromozale şi integrarea se face prin adiţie, respectiv genomul fagic se adaugă în structura genomului bacterian. Ca urmare, genomul unei bacterii lizogene este mai lung decât genomul unei bacterii normale.

Procesul de recombinare care duce la lizogenie are un caracter aparte: este o recombinare la situsuri specifice. El diferă de recombinarea genetică normală prin două aspecte; (1) se realizează sub controlul produsului genei *int*, integraza, cu activitate de topoizomerază pe ADN şi, de asemenea, sub controlul

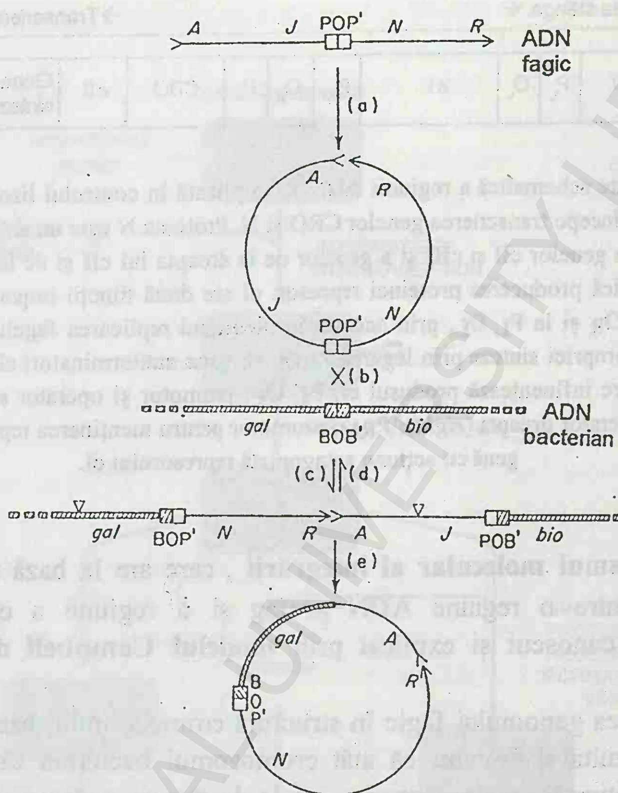


Fig. 76. Modelul Campbell de integrare a genomului λ în cromozomului bacterian (a). Circularizarea ADN λ, prin intermediul capetelor coesive (săgeţi) şi formarea legăturilor covalente (b şi c). Integrare, prin recombinare specifică de situs, între regiunile *att* ale fagului (POP') şi gazdei (BOB'). Pentru referinţă sunt notate 4 gene fagice (A, J, N, R) şi 2 clusteri de gene ale gazdei (*gal* şi *bio*). De notat că genele profagului sunt permutate faţă de cele din ADN fagic. (d) excizie normală. (e) excizie eronată, prin recombinare între alte două situsuri (∇) decât regiunile *att*, ceea ce duce la formarea unei particule defective, purtătoare de gene *gal* (sau similar *bio*) ale gazdei.

unui produs al gazdei, IHF (*integration host factor*); (2) este un proces de recombinare relativ omolog deoarece gradul de omologie între situsurile *att* profag şi bacterie se extinde numai pe 15 baze, ceea ce reprezintă o condiţie subminimală pentru recombinare. În această situaţie, participă la recombinare şi situsurile adiacente, la nivelul cărora nu mai este omologie perfectă.

Din momentul integrării genele virale se comportă asemenea genelor cromozomale, sunt replicate odată cu cromozomul bacterian și sunt transmise ca atare de la o generație de bacterii la alta. Profagul rămâne latent în celulele progenitoare și nu determină liza celulei gazdă. Profagul însă, nu rămâne permanent integrat. El poate fi indus șă-și reasume ciclul replicativ, sub acțiunea luminii ultraviolete și a anumitor substanțe chimice care deteriorează ADN. Razele ultraviolete induc sinteza unei proteaze, care clivează represorul. Funcționează apoi genele timpurii, inclusiv genele care codifică enzimele care fac excizia profagului din ADN celular. Virusul își completeză ciclul de replicare cu producerea de virus progen și liza celulei.

Rezultatele stării de lizogenie pot fi concretizate în următoarele particularități ale bacteriilor lizogene:

1.Celulele lizogene transmit informația fagică de la o generație la alta, odată cu replicarea cromozomului bacterian.

2. Bacteriile lizogene sunt imune la reinfecția cu același fag („imunitate" de suprainfecție), dar nu sunt imune la infecția cu alte tipuri de fag. Această stare de „imunitate" este specific direcționată împotriva fagului λ, deoarece represorul se leagă numai de situsurile operator ADN λ, alți fagi nefiind afectați. Este împiedicată astfel replicarea fagillor λ care ar infecta ulterior aceiași celulă gazdă.

3. Conversia lizogenă sau fagică. Fenomenul de conversie fagică reprezintă traducerea fenotipică a unei părți din genele unui profag prezent în mod persistent în celula bacteriană. Dovada în acest sens o constituie faptul că îndepărtarea profagului din cromozomul bacterian duce la revenirea bacteriilor la tipul anterior sau normal. Prin urmare celula gazdă sau bacteria lizogenă manifestă noi propietăți față de aceiași bacterie, normală (neinfectată de fagul lizogen). De exemplu, bacteria *Conynebacterium diphteriae* este un agent patogen ale cărui propietăți de patogenitate sunt corelate cu sinteza unei toxine. Bacteria este capabilă să producă toxina numai când este gazdă a unui fag temperat, deoarece profagul (β) conține gene care codifică toxina . De asemenea toxina produsă de *Clostridium botulinum* este codificată de o genă profagică. Unele specii de *Salmonella* prezintă specificități antigenice (*O*) datorită prezenței profagilor rezidenți care convertesc resturile LPS în tipuri antigenice diferite. Astfel, numărul mare de tipuri serologice la acest gen reflectă diversitatea fagică și bacteriană. *Bacillus megaterium*, prin lizogenie, suferă o modificare de la tipul de colonie S la tipul R.

Din punct de vedere formal, apariția unui nou caracter ca rezultat al lizogeniei nu este diferită de cea care ia naștere ca o consecință a dobândirii unei plasmide.

4. Inducția litică, cu posibilitatea fenomenului de transducție specializată. Bacteria lizogenă este capabilă să genereze liză fără nevoia unei infecții de la exterior. Această producere de liză se poate realiza prin trecerea profagului din starea integrată în stare vegetativă, când poate să inițieze ciclul de replicare. Inducția litică se poate face spontan (în general cu o frecvență mică) și artificial, fiind provocată experimental în laborator cu agenți fizici și chimici: raze ultraviolete, X, agenți alchilanți, peroxid, mitomicina C.

Procesul de excizie necesită intervenția a două enzime: excizionaza produsă de gena *xis* și integraza, care realizează repararea genomului. Excizia poate fi corectă, prin eliminarea din cromozomul bacterian numai a genelor fagice integrate sau poate fi eronată, prin recombinarea altor situsuri decât regiunile *att* (Fig. 76 d, e). În cazul exciziei eronate, este generată o particulă λ defectivă, care poartă gene *gal* și /sau *bio* ale gazdei. Genomul λ *gal*$^{+}$ sau *bio*$^{+}$ este defectiv pentru că în locul genelor extrase din structura cromozomului bacterian lasă din structura sa o regiune echivalentă.

Capacitatea fagului temperat λ de a lega anumite gene cromozomale și de a le introduce în altă celulă bacteriană pe care o infectează poartă denumirea de transducție specializată sau restrictivă.

Fagul temperat prin intermediul căruia se poate realiza transferul unui fragment de ADN - gazdă de la o celulă bacteriană (donator) la alta (receptor) este numit **fag transductor**, iar mecanismul corespunzător de transfer de material genetic se numește **transducție fagică**. Fenomenul de transducție caracteristic fagului λ este de **transducție specializată sau restrictivă**. Spre deosebire de **transducția generalizată** (analizată în sistemele celulă gazdă-fag: *Salmonella typhimurium / P22* și *Escherichia coli / P1*) în care aproape orice fragment de ADN-gazdă poate fi transferat și transducția poate fi urmată de *crossing-over* în celula receptor, cu producerea unui recombinant, **transducția specializată** este un proces total diferit. În transducția specializată, fagul transferă numai acei markeri genetici care sunt în aproopierea situsului de atașare a profagului pe cromozomul bacterian. În transducția generalizată oricare dintre genele bacteriene pot fi accidental împachetate în locul cromozomului

fagic în învelișul fagic corespunzător, deoarece cromozomul gazdei este degradat în cursul replicării care duce la liză. Prin urmare transducția generalizată apare ca urmare a erorilor de împachetare a ADN propriu în capsidă. Transducția specializată însă, apare ca urmare a erorilor în regiunea de recombinare la care profagul este excizat din cromozomul unei bacterii lizogene în cursul inducției litice.

Transducţia reprezintă, în natură, un proces care se realizează cu o frecvenţă mică, atât în ceea ce privește frecvența de transfer cât și cea de recombinare. Datorită numărului mare de bacterii în natură, procesul capătă însă o semnificație deosebită.

Capacitatea fagului de a lega gene cromozomale și de a le introduce în altă celulă bacteriană este folosită în practică în tehnologia ADN recombinant, pentru transfer de gene. Fagul λ este un foarte adecvat vehicul sau vector de gene deoarece el poate lega determinanți genetici străini (gene „pasager") și le poate apoi introduce în structura cromozomului bacterian, unde aceste gene pot asigura sinteza de constituenți noi. Prin această funcție de vector de clonare, fagii temperați (λ în special) sunt foarte importanți pentru tehnicile de inginerie genetică.

Starea de lizogenie, ca o relaţie între fagul temperat și bacterie, are o importanță deosebită din punct de vedere practic. Această importanță este legată de faptul că se pare că cel puțin în unele medii naturale (solul, de exemplu) lizogenia reprezintă modalitatea cea mai frecventă de menținere a fagilor în natură. Lizogenia favorizează persistența și răspândirea unui virus într-un mod mult mai subtil decât virulența. După cum a stabilit Burnet referitor la bolile virale de la organismele superioare, paraziții cel mai bine adaptați sunt cei care nu omoară rapid gazdele lor, lipsindu-se astfel singuri de oportunitatea de a se răspândi. Pe baza conceptelor generale din evoluţie se pare că starea de lizogenie ar fi benefică nu numai pentru fag, ci și pentru celula bacteriană. Preluarea de gene de către fag în cursul inducţiei și integrarea prin adiție ar reprezenta un mecanism prin care cromozomii bacterieni și-au mărit dimensiunile în cursul evoluţiei. Existența acestui proces în natură este unul din factorii importanți ai variabilității la bacterii și ai evoluţiei celulelor bacteriene, prin dobândirea de noi proprietăți. În același context, transducția reprezintă un transfer de gene cromozomale care se substituie sexualității, inexistente la bacterii.

În concluzie, fagii temperați au implicații provocatoare pentru numeroase probleme ale biologiei celulare și moleculare, cum ar fi originea virusurilor și evoluția bacteriilor; ei furnizează un mecanism important pentru transferul de gene între bacterii (transducția) și furnizează de asemenea un model pentru oncogeneza virală și pentru unele forme de latență ale virusurilor animalelor. Ciclul de evoluție al bacteriofagului λ este ilustrativ pentru manifestarea mecanismelor de reglare a exprimării genelor, care parțial pot fi extrapolate în cazul organismelor superioare, a căror structură genetică la nivel celular este mult mai complexă și dificil de abordat.

Evidențierea lizogeniei în condiții de laborator are la bază faptul că starea de lizogenie este caracterististică pentru numeroase tulpini bacteriene proaspăt izolate din mediul lor natural. Asemenea culturi lizogene conțin o concentrație scăzută de bacteriofag care poate fi recunoscut prin aceea că produce liza anumitor altor tulpini bacteriene înrudite, cunoscute ca tulpini **sensibile** sau **indicator**.

Când o tulpină bacteriană sensibilă este infectată de un bacteriofag temperat, reacţia acesteia urmează una din două căi posibile: unele celule bacteriene sunt lizate prin multiplicarea fagului, iar altele devin lizogene. Proprietatea de lizogenie a fost pentru prim oară detectată datorită culturilor de bacterii lizogene care, deși bine spălate, conțin întotdeauna unele particule fagice libere ce rezultă din liza câtorva celule.

O tulpină bacteriană poate fi recunoscută ușor ca lizogenă prin însămânțare pe mediu solid în striu încrucișat cu o tulpină sensibilă la fagul eliberat (Fig. 77). Se va observa o zonă îngustă de liză a tulpinii sensibile de-a lungul marginii tulpinii lizogene, în dreptul încrucișării. Pot fi produse astfel de tulpini lizogene care sunt desemnate prin numele tulpinii sensibile, urmat în paranteză, de cel al fagului de lizogenizare. De exemplu: *Escherichia coli K12*(λ).

Deoarece lizogenia nu poate fi recunoscută atâta timp cât nu este disponibilă o tulpină sensibilă, numeroase tulpini bacteriene (posibil majoritatea din cele cunoscute) pot fi nerecunoscute ca lizogene. În plus, multe tulpini sunt lizogene pentru mai mulți fagi diferiți.

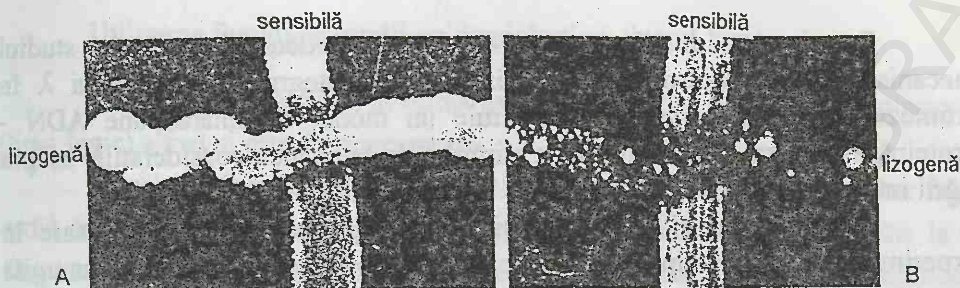


Fig. 77. Aspectul striurilor dezvoltate prin însămânțarea în cruce a două tulpini de *E. coli*: una lizogenă și una sensibilă. (A) fără tratament. (B) Cu expunere la o doză mică de raze U.V., după însămânțare, pentru inducția litică. În (A) se observă benzi înguste de liză a tulpinii sensibile (striul vertical) în dreptul încrucișării cu tulpina lizogenă (striul orizontal). În (B) se observă liza pronunțată a tulpinii sensibile în zona de încrucișare cu tulpina lizogenă, ca urmare a tratamentului de inducție care are ca rezultat liza celulară, reducerea densității striului tulpinii lizogene și eliberarea de particule infecțioase care lizează celulele tulpinii sensibile.

Importanța practică a bacteriofagilor

Având în vedere diversitatea bacteriofagilor, atât structurală cât și comportamentală, putem preciza importanța lor practică pe următoarele direcții principale:

Utilizarea ca instrumente de cercetare

Utilizarea fagilor ca material experimental are la bază avantajele conferite de faptul că numeroși fagi au o durată a ciclului litic ≤ 30 min. și o eficiență de transfer în placă (E.O.P.. = *efficiency of plating*) de 100%. Acest aspect, combinat cu timpul de dublare scurt a numeroase bacterii bine studiate (ca *Escherichia coli*), permite producerea unui număr mare de particule progene și deci plaje ușor de recunoscut și numărat în experimente de 24 de ore. Importanța fagului în studiile fundamentale de biologie a fost și continuă să fie foarte mare. O serie de descoperiri: deducerea naturii de triplet a codului genetic, testul de complementație (cis-trans) și altele care stau la baza cercetărilor actuale de genetică au fost realizate cu ajutorul fagilor, deși acest lucru este adesea neglijat.

Proprietatea de lizogenie s-a dovedit îndeosebi utilă în studiul mecanismelor de control genetic. Sistemul de integrare a profagului λ în cromozomul *Escherichia coli* constituie un model de interacțiune ADN - proteină în general. Acest sistem a stimulat de asemenea considerațiile asupra stării intracelulare a retrovirusurilor de la eucariote.

Fagii au fost și sunt utilizați și adaptați ca vectori de clonare în experimentele de manipulare genetică la *Escherichia coli* și, într-o anumită măsură, la alte organisme. Din acest punct de vedere s-au dovedit utili: fagul ADNmc M13 și fagul λ (ADNd.c.). Prin asemenea experimente a fost posibilă obținerea unui hibrid între λ și o plasmidă (cosmida), a unor biblioteci de gene și a altor realizări cu implicații practice deosebite.

Implicațiile fagilor în procesele industriale

Într-o serie de cazuri, infecția fagică a bacteriilor utilizate în procese economice importante este suficient de stânjenitoare pentru a reclame măsuri preventive. Astfel spre exemplu, culturile starter de streptococi lactici utilizate la fabricarea brânzeturilor sunt susceptibile la atacul fagilor corespunzători, necesitând utilizarea unor culturi *starter* mixte sau a unui mediu fără calciu. De asemenea, unele actinomicete utilizate la producerea antibioticelor sunt susceptibile la atacul fagilor (actinofagi) ceea ce necesită măsuri adecvate.

Fagii ca agenți terapeutici

Sugestia privind posibilitatea susceptibilității bacteriilor patogene la un agent litic a constituit motivația considerabilă a experimentelor realizare de Twort (în 1915) și d'Herelle (1917), care au condus la descoperirea bacteriofagului. În primii ani de la descoperire, au fost realizate numeroase cercetări asupra posibilității utilizării fagilor în terapia antibacteriană. Rezultatele acestor cercetări au dezamăgit, cauzele fiind: imunogenitatea puternică a particulelor fagice și/sau labilitatea lor în condițiile fiziologice ale organismului (pH scăzut la nivelul stomacului). Astfel interesul pentru valoarea fagului în controlul infecțiilor bacteriene a scăzut odată cu introducerea antibioticelor. Cu toate acestea, problemele asociate terapiei cu antibiotice au readus în actualitate problema abordării lipsite de riscuri și necostisitoare a infecțiilor bacteriene. În ultimul deceniu au fost obținute rezultate experimentale pe animale, privind utilizarea preparatelor fagice în infecții cu tulpini de bacterii enteropatogene și supravegherea factorilor care influențează menținerea fagului *in vivo*.

Utilizarea fagului în studii epidemiologice: tipajul fagic

Utilizarea fagilor litici în tipizarea epidemiologică a bacteriilor patogene (tipaj fagic) a fost și este de mare succes.

Principiul tipajului fagic constă în spectrul de gazdă limitat al multor fagi, astfel încât pot fi derivate linii fagice capabile de stabilirea unui ciclu litic la o singură tulpină a unei specii bacteriene. Această specificitate face posibilă utilizarea fagilor în discriminarea între tulpini bacteriene care prin metode serologice sau biochimice nu pot fi distinse. În felul acesta poate fi studiată distribuția și răspândirea unei bacterii patogene în cadrul unei comunități. Metoda permite, de exemplu, discriminarea între tulpini care au cauzat infecția ca rezultat al nerespectării normelor sanitare în țara de rezidență a pacientului și acelea introduse ca rezultat al infecției contractate în intervalul unei călătorii în străinătate.

Tehnica este utilizată în special pentru speciile genului *Salmonella* (*S. typhi, S. paratyphi, S. typhimurium, S. enteritidis* și altele) și *Staphylococcus aureus*.

Un avantaj al tipajului fagic față de alte metode de subdivizare a speciilor bacteriene este simplitatea: necesită numai înregistrarea prezenței sau absenței plajelor de liză fagică (lizotipie). Se utilizează anumiți parametri pentru reproductibilitatea rezultatelor.

Tipizarea este realizată în centre naționale unde pot fi tipizate mai multe tulpini printr-un *screening* unic.

Rolul fagilor în controlul numărului de bacterii (dovedit, printre altele, de concentrațiile ridicate de fagi în apele naturale: 10^8 / ml) și posibil, de asemenea, în schimbul de material genetic dintre bacterii s-a dovedit a fi mult mai mare decât cel presupus anterior.

Multiplicarea virusurilor animalelor

Deși diferitele grupe de virusuri ale animalelor sunt replicate în locuri diferite ale celulei și prin strategii diferite, procesul de bază este asemănător ca linie de ansamblu: diferitele componente virale sunt sintetizate separat și apoi asamblate eficient în virioni maturi.

Acidul nucleic viral conține informație numai pentru sinteza diferitelor proteine virale: - enzime virale care reglează replicarea acidului nucleic și sunt sintetizate timpuriu în cursul procesului infecțios; - alte enzime care pot fi incluse în virioni; - proteine structurale virale.

Toate ciclurile de replicare au mecanisme de control complexe, atât pentru activitățile celulare cât și virale, conducând la formarea de proteine virale. Pentru procesele de replicare sunt utilizate diferite organite celulare (aparat Golgi, porțiuni ale reticulului endoplasmic rugos).

Multiplicarea virusurilor animalelor urmează modelul de bază al multiplicării bacteriofagilor față de care însă prezintă și unele diferențe notabile, pe care le vom preciza ulterior (vezi Tabel. 9).

Ciclul de replicare virală poate fi analizat și descris în două moduri diferite. Prima abordare este obținerea unei curbe de creștere (în sensul sporirii numărului de particule virale) care arată cantitatea de virus produs, la timpi diferiți după infecție. A doua este descrierea pe etape a evenimentelor specifice care au loc în interiorul celulei gazdă în cursul multiplicării virusului. În ambele abordări se ia în considerație relația virus-celulă gazdă sensibilă corespunzând tipului de infecție productivă.

Curba de creștere virală

O curbă de creștere tipică este reprezentată după coordonatele utilizate pentru obținerea curbei de evoluție a bacteriofagilor (Fig. 78). Cantitatea de virus produs este trasată pe o scală logaritmică funcție de timpul scurs după infecție. Este de reținut faptul că față de bacteriofagi la care timpul necesar pentru „ciclul de creștere" se apreciază în minute (Fig. 65), la unele virusuri umane, de exemplu, se apreciază în ore. Pe grafic se observă dispariția virusului, reprezentată de linia continuă care cade în axa X. Deși particula virală ca atare nu mai este prezentă, acidul nucleic viral continuă să funcționeze și începe să se acumuleze în interiorul celulei, după cum arată linia neîntreruptă. Perioada de timp în cursul căreia nu se

găsește virus ca atare în interiorul celulei este cunoscută ca **perioadă de eclipsă.** Această perioadă se încheie cu apariția virusurilor (linia neîntreruptă). Spre deosebire de aceasta, perioada de latență este definită ca perioadă de timp de la instalarea infecției la apariția virusului extracelular.

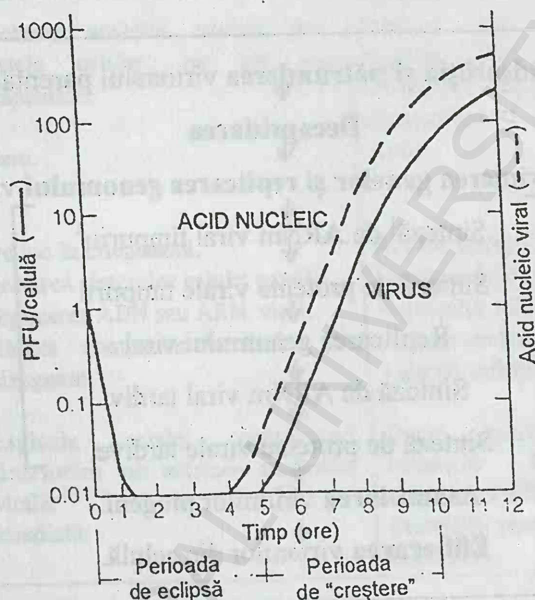


Fig. 78. Curba de „creștere virală". În perioada de eclipsă nici un virus infecțios nu este detectabil în celulele infectate. PFU = unități formatoare de plaje (măsură a numărului de unități infecțioase virale). În această curbă, cantitatea de virus infectat este 1 PFU/celulă, adică 1 unitate infecțioasă/celulă.

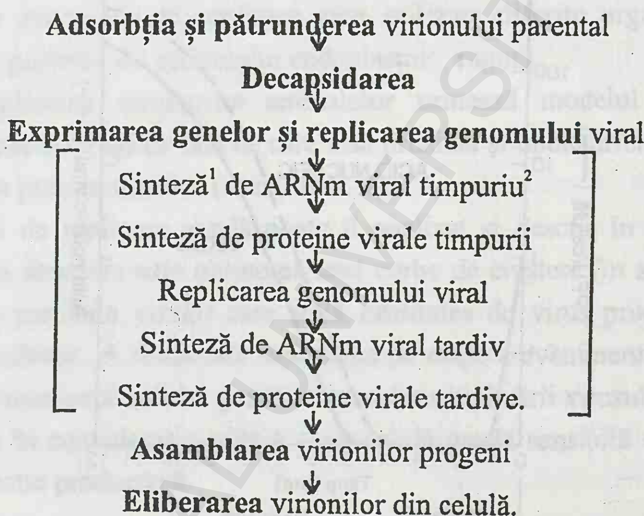
De reținut, că infecția este inițiată de o particulă virală și se încheie cu producerea a sute de particule virale (infecție productivă). Către sfârșitul perioadei de latență încep să apară alterări morfo-funcționale ale celulelor. **Efectul citopatic** culminează cu liza și moartea celulelor. Nu toate virusurile au efect citopatic; unele își realizează replicarea consecutiv unor modificări minime, morfologice și funcționale, ale celulei.

Etapele ciclului de replicare.

Evenimentele specifice etapelor ciclului de replicare sunt menționate în Tabelul 8.

Tabelul nr. 8

Etapele succesive ale multiplicării virusurilor animalelor.



[1] În unele cazuri genomul viral este funcțional echivalent cu ARNm; astfel nu este necesară sinteza ARNm timpuriu.

[2] Termenul „timpuriu" definește perioada anterioară replicării genomului. Nu toate virusurile manifestă o distincție între funcțiile timpurii și cele tardive. În general proteinele timpurii sunt enzime, în timp ce proteinele tardive sunt componente structurale ale virusului.

La modul general, particula virală parentală, infectantă, se atașează de membrana celulei și apoi pătrunde în celula gazdă. Genomul viral este „dezvelit" prin îndepărtarea proteinelor capsidale și lăsat liber să funcționeze. Are loc sinteza de ARNm și proteine timpurii - enzime utilizate pentru replicarea genomului viral. Sunt apoi sintetizate ARNm și proteinele tardive - proteine structurale, capsidale. Virionii progeni sunt asamblați din: material genetic replicat și noile proteine capsidale formate, după care sunt eliberați din celulă.

Tabelul nr. 9

Comparație între multiplicarea bacteriofagilor și a virusurilor animalelor.

	Bacteriofagi	**Virusuri ale animalelor**
Adsorbție	Atașare precisă a fibrelor speciale ale cozii de peretele celular.	Atașarea spiculelor, capsidei sau anvelopei de receptorii suprafeței celulare.
Pătrundere	Injectarea acidului nucleic prin peretele celular; nu are loc decapsidare.	Întregul virus pătrunde (este înglobat sau fuzionează cu membrana celulară); are loc decapsidare.
Starea de eclipsă	Apare.	Apare.
Replicare și maturare	Are loc în citoplasmă. Încetarea sintezelor celulei gazdă. Replicarea ADN sau ARN. viral. Sinteza componentelor virale.	Are loc în citoplasmă și nucleu. Încetarea sintezelor celulei gazdă. Replicarea ADN sau ARN viral Sinteza componentelor virale.
Persistența virală.	Lizogenie.	Latență, infecții cronice, cancer.
Eliberarea din celula gazdă	Explozia celulei consecutivă deteriorării sub acțiunea enzimelor virale.	Unele celule sunt lizate; virusurile anvelopate sunt eliberate prin înmugurire.
Distrugerea celulei	Imediată.	Imediată; pentru unele virusuri- întârziată.

Un alt mod general de a descrie ciclul de replicare corespunde grupării evenimentelor care au loc în: (1) evenimente timpurii: **adsorbția** (atașarea), **pătrunderea și decapsidarea**; (2) evenimente mijlocii: **exprimarea genelor și replicarea genomului**; (3) evenimente tardive: **asamblarea și eliberarea.** Ținând cont de această secvență, fiecare etapă va fi descrisă în detaliu, pornind de la precizarea diferențelor esențiale între multiplicarea bacteriofagilor (descrisă anterior) și multiplicarea virusurilor animalelor (care urmează a fi detaliată). Aceste diferențe (Tabel 9) constau, în principal, în următoarele:

- Virusurile animalelor diferă de fagi prin mecanismul lor de pătrundere în celula gazdă, ceea ce implică existența unei etape ulterioare suplimentare: decapsidarea.

- Sinteza și asamblarea componentelor virale noi este întrucâtva diferită, între cele două categorii de virusuri, parțial datorită diferențelor dintre celulele procariote și eucariote, ca celule gazdă.

- Virusurile animalelor pot conține anumite tipuri de enzime, care nu se găsesc în fagi.

- Mecanismele de maturare (asamblare) și eliberare, ca și efectele asupra celulei gazdă diferă la cele două categorii de virusuri.

Analiza ulterioară a etapelor multiplicării virusurilor animalelor ia în considerație mai întâi procesele comune atât virusurilor ARN cât și ADN: adsorbția, pătrunderea și decapsidarea. Apoi ne vom referi la modul în care virusurile ARN și virusurile ADN diferă în privința proceselor de biosinteză, maturare și eliberare din celula gazdă.

Adsorbția

Ca și bacteriofagii, virusurile animalelor au un situs de adsorbție care se atașează de situsurile receptor complementare de pe suprafața celulei gazdă (Fig. 79). Situsurile receptor de pe celulele animale sunt reprezentate de proteine și glicoproteine de pe membrana celulară. Situsurile de adsorbție ale virusurilor animalelor sunt distribuite pe suprafața virusului și variază de la un grup de virusuri la altul. La adenovirusuri, care sunt virusuri icozaedrice nude, situsurile de adsorbție sunt reprezentate de fibrele mici de la colțurile (din dreptul pentonilor) icozaedrului. La multe virusuri anvelopate, ca de exemplu myxovirusurile și H.I.V., situsurile de adsorbție sunt reprezentate de spiculele localizate la nivelul anvelopei. Imediat ce spiculele se atașează de un receptor al celulei gazdă, migrează spre virus situsuri receptor adiționale de pe aceeași celulă. Prin atașarea a numeroase asemenea situsuri, adsorbția este completă și ea este amplificată de prezența cationilor.

Unele virusuri au nevoie de a se lega foarte specific de suprafața celulelor gazdă (citotropism), ceea ce are consecințe majore pentru patogenitate. Specificitatea de atașare determină spectrul de gazdă al virusului. Unele virusuri au un spectru îngust, în timp ce altele au un spectru larg. De exemplu, poliovirusul poate pătrunde numai în celulele umane și ale altor primate, în timp ce virusul rabic poate pătrunde în celulele tuturor mamiferelor. Specificitatea de organ a virusurilor este guvernată de asemenea de interacțiunea la nivel de receptor. Receptorii celulari, care au fost identificați, s-au dovedit a fi proteine

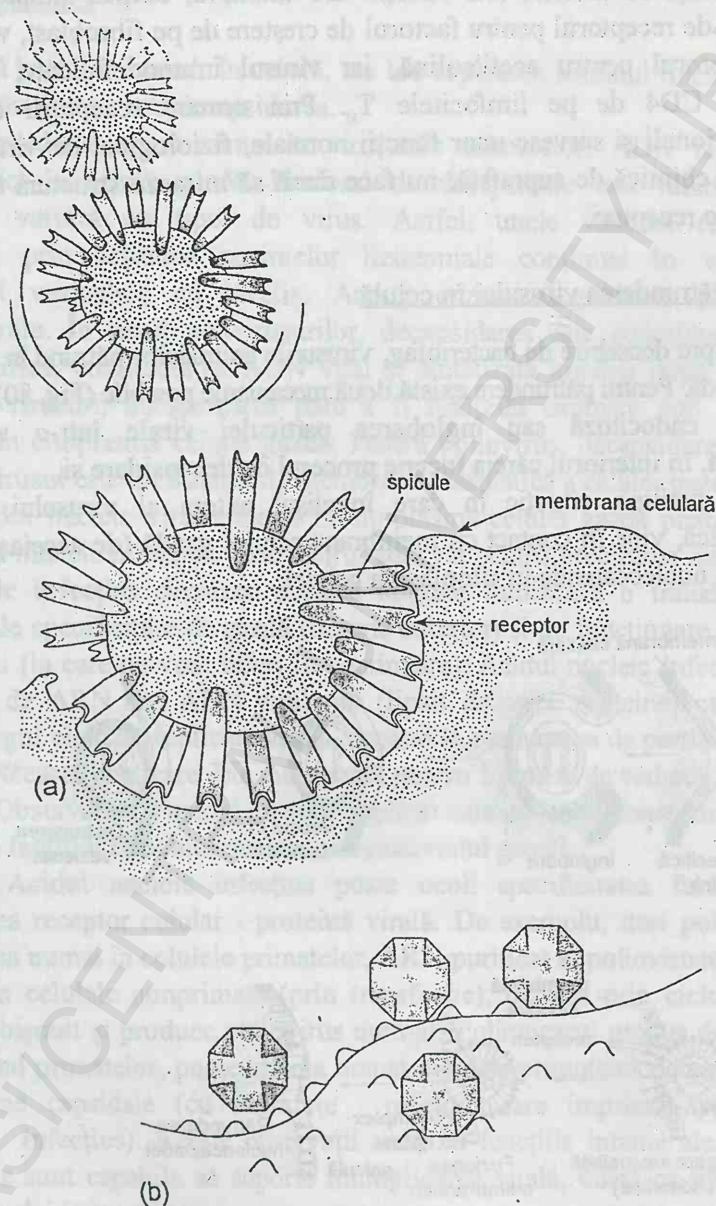


Fig. 79. Modul în care virusurile animalelor se atașează de membrana celulei gazdă. (a) Un virus cu spicule. Configurația spiculelor are un situs complementar receptorului celular. (b) Componente de suprafață ale capsidei nude se atașează de receptorii membranei.

de suprafață cu diferite alte funcții. De exemplu, herpes simplex virus I se atașează de receptorul pentru factorul de creștere de pe fibroblast, virusul rabic - de receptorul pentru acetilcolină, iar virusul imunodeficienței umane - de proteina CD4 de pe limfocitele T_H. Prin urmare receptorii celulari sunt polifuncționali și servesc unor funcții normale, fiziologice, iar virusul, printr-o structură chimică de suprafață, nu face decât să mimeze structura care se leagă normal de receptori.

Pătrunderea virusului în celulă

Spre deosebire de bacteriofag, virusurile animalelor pătrund în întregime în celula gazdă. Pentru pătrundere există două mecanisme posibile (Fig. 80):

- endocitoză sau înglobarea particulei virale într-o veziculă de pinocitoză, în interiorul căreia începe procesul de decapsidare și,
- fuziune, situație în care învelișul extern al virusului, de natură fosfolipidică, vine în contact cu membrana celulei gazdă (de aceeași natură) și eliberează nucleocapsida în citoplasma celulei.

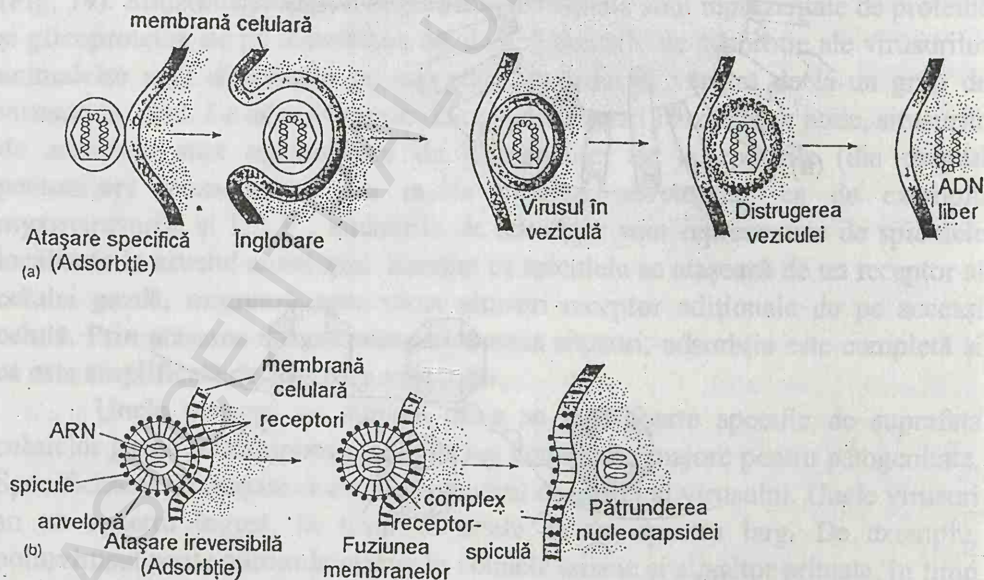


Fig. 80. Modalitățile principale prin care virusurile animalelor pătrund în celula gazdă. (a) Endocitoză (înglobare) și decapsidarea unui herpesvirus. (b) Fuziunea virusului rujeolei cu membrana celulară.

Decapsidarea

Odată pătruns virusul în celulă, are loc separarea acidului nucleic viral de învelişul său proteic sau decapsidarea.

Decapsidarea apare numai la virusurile animalelor; ADN fagic este introdus direct în celula gazdă. Procesul de decapsidare este relativ puţin cunoscut şi variază cu tipul de virus. Astfel, unele virusuri realizează decapsidarea prin acţiunea enzimelor lizozomale conţinute în vacuolele fagocitare şi veziculele cu înveliş. Aceste enzime degradează proteinele capsidale virale. În cazul poxvirusurilor, decapsidarea este completată de o enzimă specifică, codificată de ADN viral şi sintetizată imediat după infecţie. Pentru alte virusuri, decapsidarea pare a fi realizată exclusiv sub acţiunea enzimelor din citoplasma celulei gazdă. Pentru poliovirus, decapsidarea începe în timp ce virusul este încă ataşat de membrana plasmatică a celulei gazdă.

Acidul nucleic viral eliberat în citoplasma celulei gazdă poate sau nu poate fi acid nucleic infecţios. Este cadrul adecvat pentru precizarea noţiunii de **acid nucleic infecţios** deoarece această noţiune furnizează o tranziţie între conceptele de specificitate de gazdă (descris anterior) şi de funcţionare timpurie a genomului (la care ne vom referi în continuare). Acidul nucleic infecţios este reprezentat de ARN sau ADN viral pur (lipsit de orice proteine) care poate realiza întregul ciclu de replicare virală, ducând la producerea de particule virale complete. Această precizare este interesantă pentru 3 puncte de vedere:

1. Observaţia că acidul nucleic implicat este infecţios constituie dovada definitivă a faptului că acidul nucleic este materialul genetic.

2. Acidul nucleic infecţios poate ocoli specificitatea furnizată de interacţiunea receptor celular - proteină virală. De exemplu, deşi poliovirusul poate evolua numai în celulele primatelor, ARN purificat al poliovirusului poate pătrunde în celulele nonprimate (prin transfecţie), trecând prin ciclul său de replicare obişnuit şi produce poliovirus normal. Poliovirusul produs de celulele neaparţinând primatelor, poate infecta numai celulele primatelor deoarece acum are proteine capsidale (cu suprafeţe - receptor care imprimă specificitate procesului infecţios). Aceste observaţii arată că funcţiile interne ale celulelor nonprimate sunt capabile să suporte multiplicarea virală, odată ce pătrunderea acidului nucleic a avut loc.

3. Numai anumite virusuri produc acid nucleic infecţios, din motive explicate în cele ce urmează.

Exprimarea genelor virale și replicarea genomului

Înainte de această etapă, pentru unele virusuri, există o fază de deplasare a genomului viral liber (virus vegetativ) la locul sintezei. Această fază este accesorie pentru că în cazul virusurilor care se replică în citoplasmă, imediat după pătrundere și decapsidare, ele se găsesc în locul respectiv.

Prima treaptă în exprimarea genelor virale este sinteza ARNm. Din acest moment, procesele de biosinteză a componentelor virale, declanșate de exprimarea genelor virale, urmează căi diferite în funcție de natura acidului nucleic viral (ADN sau ARN) și locul din celulă în care are loc replicarea.

Virusurile ADN, cu o excepție, se replică în nucleul celulei (Fig. 81) și utilizează pentru sinteza ARNm, ARN-polimeraza dependentă de ADN a celulei gazdă. Excepția este reprezentată de poxvirusuri, deoarece ele se replică în citoplasmă, unde nu au acces la ARN-polimeraza celulei gazdă. De aceea ele conțin propria ARN-polimeraza în interiorul particulei virale.

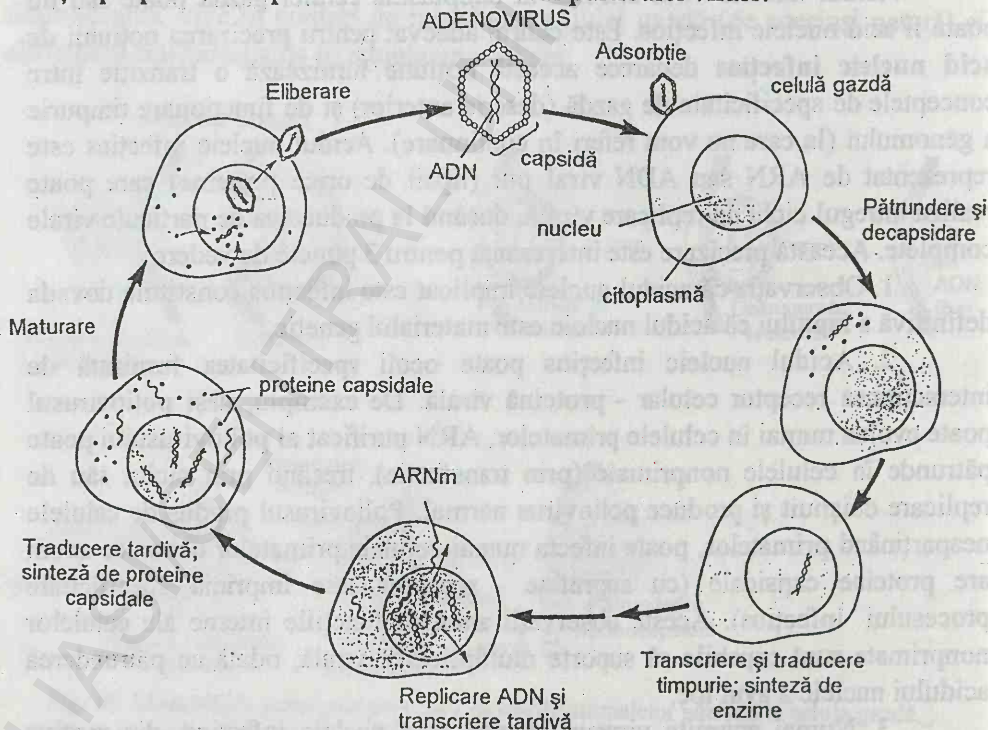


Fig. 81. Multiplicarea adenovirusului, un virus cu genom ADNdc.

Exprimarea genelor virale, corespunzătoare structurii genetice de tip eucariot a genomului viral - ADN, implică mecanisme de transcriere genetică și traducere a informației genetice la proteine, mai complicate decât în cazul bacteriofagilor (ADN) la care ne-am referit.

Biosinteza proteinelor timpurii, care precede replicarea genomului viral, se face prin transcrierea (la ARNm viral timpuriu) și traducerea informației genetice parentale (introduse prin infecția virală). Principalele proteine timpurii sunt proteinele enzimatice necesare replicării genomului viral.

Replicarea genomului viral are drept rezultat producerea în celula gazdă a unui număr foarte mare de copii ale genomului viral. Procesul este guvernat de principiul complementarității (vezi Tabel 10), conform căruia este necesară sinteza unei catene (forma intermediară) cu o secvență complementară de baze; această catenă servește apoi ca matriță (*template*) pentru sinteza genomului viral progen.

Virusul hepatitei B, cu ADNdc ca genom parental, utilizează ca formă intermediară ARNmc^{+} pentru sinteza genomului progen (ADNdc). Alte virusuri ADNdc (papovavirus, adenovirus, herpesvirus, poxvirus), realizează replicarea ADN prin același proces semiconservativ prin care este sintetizat ADN celular.

Biosinteza proteinelor tardive începe pe măsură ce replicarea genomului viral continuă fiind în mare măsură suprapusă pe etapa replicării genomului. În unele cazuri genomurile virale progene pot servi ca *templates* pentru ARNm tardiv care, prin traducere, dă naștere acestor proteine. Tipul principal și preponderent cantitativ de proteine tardive este reprezentat de **proteinele structurale**. Dintre acestea, majoritatea intră în structura capsidei (proteine capsidale) restul fiind reprezentat de proteine de membrană și proteine virale, care uneori intră în compoziția învelișului extern. Celelalte tipuri de proteine tardive sunt: • **proteinele de reglare**, cu rol esențial în stoparea funcțiilor timpurii și în asigurarea unei replicări economice a virusului respectiv; • **proteinele de morfogeneză**, care, cel puțin la unele virusuri participă la procesul de asamblare a capsidei și • **proteinele - enzime**, care favorizează eliberarea virusurilor din celula gazdă.

Tabelul nr. 10

Complementaritate în replicarea genomului viral

	Prototipul de virus	Genomul parental[1]	Forma intermediară	Genomul progen
ADN	Virusul hepatitei B	ADNdc	ARNmc+	ADNdc
	Papovavirus Adenovirus Herpesvirus Poxvirus	ADNdc		ADNdc
ARN	Poliovirus	ARNmc+	ARNmc-	ARNmc+
	Virus influenza, v. rujeolos, v. rabic	ARNmc-	ARNmc+	ARNmc-
	Reovirus	ARNdc	ARNmc+	ARNdc
	Retrovirus	ARNmc+	ADNdc	ARNmc+

[1] Legendă: mc, monocatenar; dc, dublucatenar; +, polaritate pozitivă; -, polaritate negativă.

Virusurile ARN reprezintă, ca entități, un caz deosebit în Biologie, prin aceea că informația lor genetică este înscrisă în ARN. Prin aceasta ele reprezintă o excepție de la sensul cunoscut al fluxului de informație în toate sistemele biologice: ADN ⟶ ARN ⟶ proteine. De asemenea, virusurile cu genom ARN, în loc să se bazeze pe o singură strategie pentru replicarea lor, au dezvoltat în acest scop mai multe strategii. Din acest punct de vedere, virusurile ARN pot fi împărțite în 4 grupe cu strategii total diferite pornind de la mecanismele diferite de formare a ARNm, (Fig. 82 și Tabel 11), necesar pentru sinteza proteinelor. Multiplicarea virusurilor ARN are loc în citoplasma celulelor gazdă, iar diferențele majore între procesele de multiplicare a acestor virusuri rezidă în modalitatea prin care sunt produși ARNm și ARN viral.

1. Strategia cea mai simplă este ilustrată de poliovirus, care are ca material genetic **ARN monocatenar (mc) de polaritate pozitivă** (+). (Polaritatea este definită ca pozitivă pentru un ARN cu aceeași secvență de baze cu ARNm. ARN cu polaritate negativă (-) are o secvență de baze care este complementară cu ARNm. De exemplu, dacă secvența ARNm este A-C-U-G, un ARN cu polaritate - ar fi de secvența U-G-A-C și un ARN cu polaritate + ar fi de secvența A-C-U-G). Aceste virusuri utilizează propriul genom ARN direct ca ARNm. De asemenea, utilizând catena + ca *template*, ele transcriu catene - pentru a produce catene + adiționale, care servesc fie ca ARNm, fie ca genom viral de incorporat în proteinele capsidale.

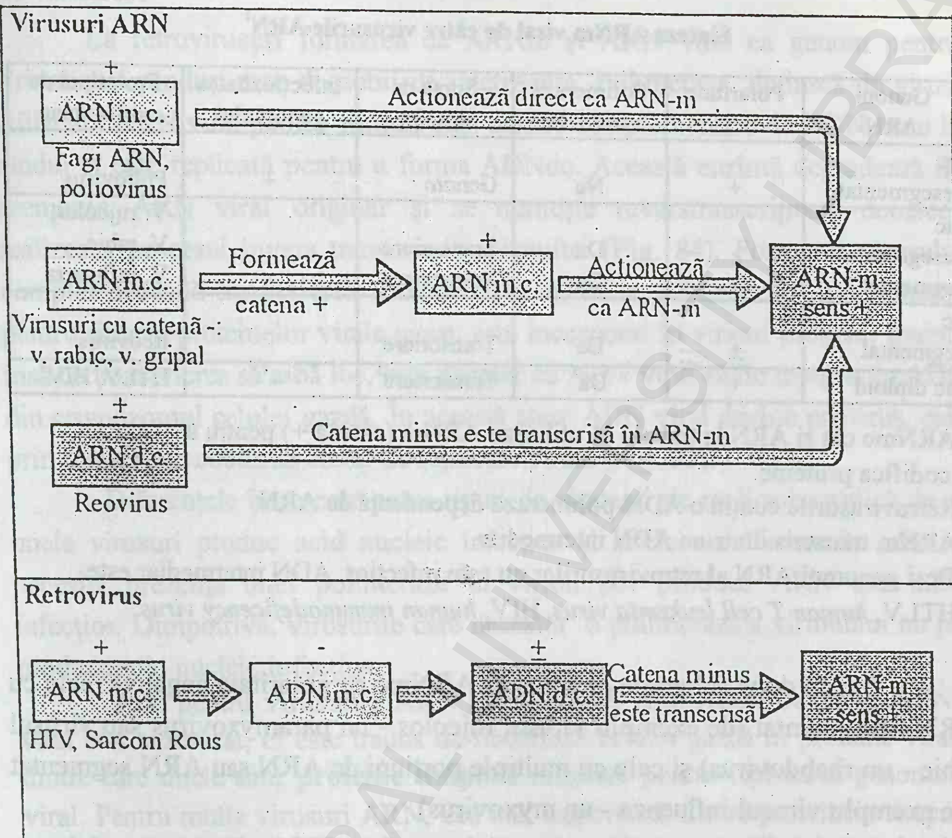


Fig. 82. Formarea de ARNm după infecţia celulelor cu diferite tipuri de virusuri ARN. Secvenţa de nucleotide a ARNm este considerată ca sens plus (+). Sensul catenelor diferiţilor acizi nucleici virali este notat cu + dacă este identic cu ARNm; - dacă este de sens opus şi ± dacă este dublu catenar.

2. Al doilea grup, are ca material genetic **ARNmc de polaritate negativă**. Utilizând catena negativă ca *template* trebuie transcris un ARNm. Deoarece celula nu are o ARN-polimerază capabilă să utilizeze ARN ca *template*, virusurile poartă propria ARN-polimerază dependentă de ARN. Aceste virusuri trebuie să transcrie o catenă + pentru a servi ca ARNm, înainte de a începe biosinteza proteinelor. ARNm este transcris în catene minus adiţionale pentru a fi incorporate ca genom în învelişul proteic capsidal.

Tabelul nr. 11

Sinteza ARNm viral de către virusurile ARN[1]

Genom ARN	Polaritate	Polimeraza virionului	Sursa de ARNm	Infecţiozitatea genomului	Prototipul de virus uman
mc nesegmentat	+	Nu	Genom	+	Poliovirus
mc nesegmentat segmentat	- -	Da Da	Transcriere Transcriere	- -	V. rujeolos, V. rabic. V. influenza
dc segmentat	±	Da	Transcriere	-	Reovirus
mc diploid	+	Da[2]	Transcriere[3]	-[4]	HTLV, HIV[5]

[1]. ARNmc cât şi ARNdc trebuie să utilizeze ARNm (catenă +) pentru a codifica proteine.
[2]. Retrovirusurile conţin o ADN-polimerază dependentă de ARN.
[3]. ARNm transcris dintr-un ADN intermediar.
[4]. Deşi genomul ARN al retrovirusurilor nu este infecţios, ADN intermediar este.
[5]. HTLV, *human T cell leukemia virus*, HIV, *human immunodeficency virus*.

Există două subgrupe de virusuri ARNmc cu polaritate negativă: cele cu ARN nesegmentat (de exemplu virusul rujeolos - un paramyxovirus sau virusul rabic - un rhabdovirus) şi cele cu multiple porţiuni de ARN sau ARN segmentat (de exemplu virusul influenza - un myxovirus).

3. Al treilea grup, are ca material genetic **ARNdc**. Deoarece celula nu dispune de enzima capabilă să transcrie acest ARN în ARNm, virusul poartă propria polimerază. Cel mai bine studiat membru al acestui grup: reovirusul, are genomul alcătuit din 10 segmente de ARNdc. ARNm(+) serveşte de asemenea ca *template* pentru sinteză de catene ARN(-). Catenele ARNm(+) şi cele minus formează ARNdc care este apoi înconjurat (ca genom viral progen) de proteinele capsidale.

4. Cel de-al patrulea grup, exemplificat de retrovirusuri, are ca genom **ARNmc de polaritate pozitivă**, care este transcris în ADNdc de către ADN-polimearaza dependentă de ARN (**reverstranscriptaza**) purtată de virus (Fig. 83 şi 84). Această copie este apoi transcrisă în ARNm viral de către ARN-polimeraza celulei gazdă.

La retrovirusuri formarea de ARNm și ARN viral ca genom pentru virionii noi produși este deosebit de interesantă. Polimeraza, deținută de virus, utilizează ARN viral pentru sinteza unei catene complementare de ADN, care la rândul ei este replicată pentru a forma ADNdc. Această enzimă degradează de asemenea ARN viral originar și se numește reverstranscriptază deoarece realizează procesul invers transcrierii obișnuite. (Fig. 84). Formarea virusului complet necesită transcrierea (obișnuită) a ADN la ARNm care funcționează pentru sinteza proteinelor virale și/sau este incorporat în virioni progeni. Înainte însă ca transcrierea să aibă loc, este necesar ca ADN viral să fie integrat în ADN din cromozomul celulei gazdă. În această stare ADN viral devine provirus, care prin transcriere continuă ciclul de replicare virală (Fig. 83).

Diferențele între cele patru tipuri de strategii de replicare explică de ce unele virusuri produc acid nucleic infecțios și altele nu. Virusurile care nu necesită prezența unei polimeraze în virion pot produce ARN sau ADN infecțios. Dimpotrivă, virusurile care necesită o polimerază a virionului nu pot produce acid nucleic infecțios.

Atât pentru virusurile ARN cât și pentru cele ADN, odată ce ARNm viral este sintetizat, el este tradus de ribozomii celulei gazdă în proteine virale, dintre care unele sunt **proteine timpurii** necesare pentru replicarea genomului viral. Pentru multe virusuri ARN, cea mai importantă dintre proteinele timpurii este polimeraza, care va sintetiza numeroase copii ale materialului genetic viral pentru particulele progene.

Replicarea genomului viral este guvernată, ca și în cazul genomului ADN, de principiul complementarității, exemplificările din Tabelul 10 clarificând acest principiu și pentru virusurile ARN: - **poliovirusul** produce o catenă negativă, intermediară, care este *template* pentru catena pozitivă a genomului; - **virusurile: influenza, rujeolei și rabiei** produc o catenă pozitivă intermediară care este *template* pentru catena negativă a genomului; -**reovirusul** produce o catenă pozitivă care acționează atât ca ARNm cât și ca *template* pentru catena negativă în genomul ARNdc; - **retrovirusurile** utilizează catena minus a ADN intermediar pentru a produce ARNmc (+) progen.

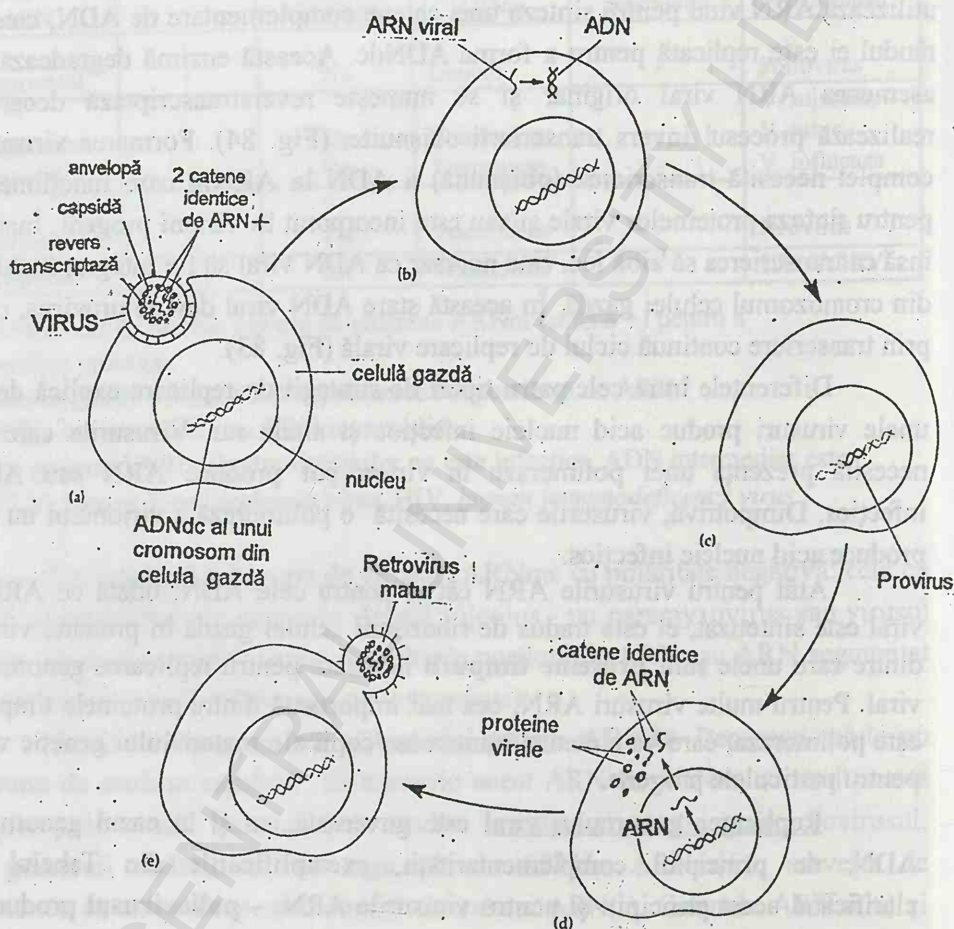


Fig. 83. Multiplicarea unui retrovirus. a) Pătrunderea în celula gazdă prin pinocitoză. b) După decapsidare, transcrierea inversă a genomului viral, ARN, produce ADNdc. c) ADNdc este transportat în nucleul celulei gazdă și integrat, ca provirus, în ADN celular. În acest stadiu, celula gazdă se poate divide normal indefinit. Toate celulele progene vor moșteni gene virale, dar genele rămân latente până când sunt transcrise. d) Dacă are loc transcrierea ARN, catenele + noi servesc atât ca ARNm pentru a codifica proteinele capsidale, cât și ca genomuri virale. e) Două catene + ARN identice sunt incorporate într-o capsidă și eliberate.

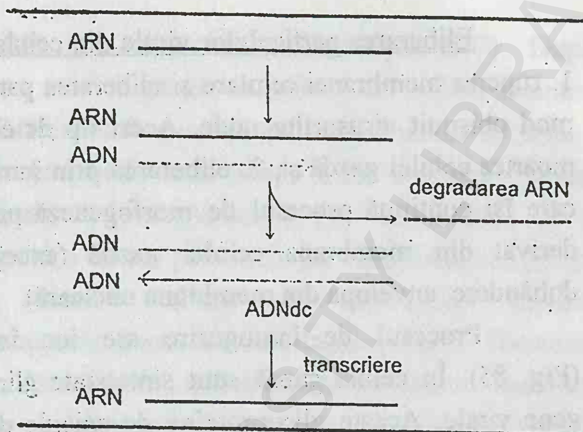


Fig. 84. Acțiunea reverstranscriptazei. Această enzimă catalizează sinteza unei catene de ADN de pe o matriță („template") de ARN. Catena ARN este apoi degradată și este sintetizată altă catenă de ADN, complementară primeia. ADNdc astfel produs servește ca „template" pentru transcriere, cu formare atât de ARNm cât și de ARN necesar ca genom noilor virioni.

Biosinteza **proteinelor tardive**, care are loc pe măsură ce replicarea genomului viral continuă, asigură necesarul de proteine capsidale - structurale ce vor fi utilizate pentru morfogeneza (asamblarea) particulelor virale progene.

Morfogeneza (asamblarea sau maturarea) și eliberarea virusurilor animalelor

Particulele progene sunt asamblate prin împachetarea acidului nucleic viral în interiorul proteinelor capsidale. Etapa de morfogeneză a virusurilor implică: formarea capsidei, respectându-se normele de simetrie; înglobarea genomului viral și, unde este cazul, formarea învelișului extern.

Procesul de asamblare a capsidei proteice este diferit de la caz la caz. În mod obișnuit, este un proces spontan realizându-se prin autoasamblare: așezarea spontană a capsomerelor într-o formă simetrică, regulată, care constituie, după împachetarea acidului nucleic viral, particula virală matură. La unele virusuri, cu o structură mai complexă, morfogeneza este controlată genetic realizându-se prin intervenția produșilor anumitor gene. Virusurile cu înveliș extern reprezintă un caz aparte, în care procesul de morfogeneză este corelat cu eliberarea din celula gazdă.

Eliberarea particulelor virale din celule se realizează prin două procese: 1. ruperea membranei celulare și eliberarea particulelor mature, caracteristică în mod obișnuit virusurilor nude. Acest tip de eliberare duce în mod obișnuit la moartea celulei gazdă și, 2. eliberarea prin înmugurire, caracteristică virusurilor care își continuă procesul de morfogeneză prin formarea unui înveliș extern derivat din membrana celulei gazdă (exceptând herpesvirusurile care își dobândesc anvelopa din membrana nucleară).

Procesul de înmugurire are loc într-o serie de faze succesive (Fig. 85). În celula gazdă sunt sintetizate glicoproteine virale, specificate de gene virale. Aceste glicoproteine de spicule devin constituenți ai membranei celulare prin dislocare: ele sunt incorporate în membrana celulară înainte de a începe înmugurirea. Pe suprafața internă a regiunii membranei plasmatice care conține glicoproteine virale se atașează proteina de matrice (M) virală. Această proteină virală specială îndeplinește rolul de situs de recunoaștere pentru nucleocapsidă și de structură de stabilizare. Membrana celulei suferă un proces de evaginare, formând un mugure care prin strangulare eliberează virionul matur format, acoperit de învelișul extern (derivat din membrană).

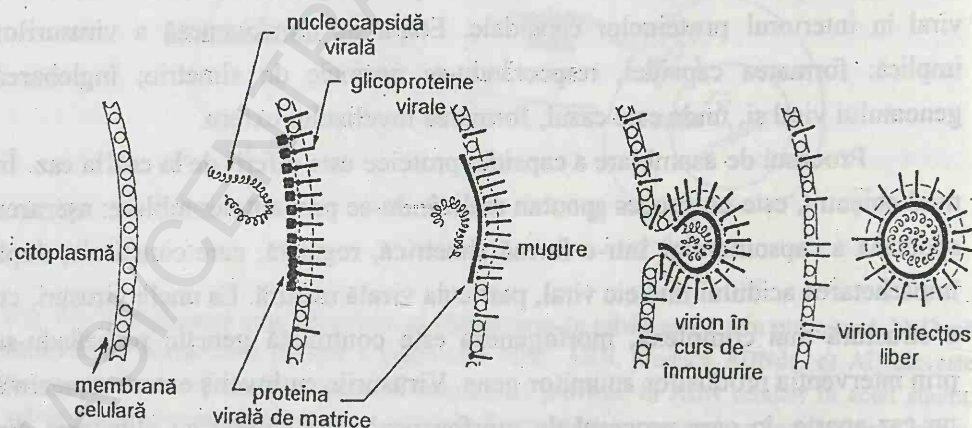


Fig. 85. Înmugurirea unui virus anvelopat (orthomyxovirus sau paramyxovirus). Explicații în text.

La suprafața unei celule pot exista muguri multipli (5-7). După eliberarea virionului, membrana celulei gazdă se reface dar suferă alterări. Glicoproteinele incorporate în membrană conferă celulei infectate cu ortho- și/sau paramyxovirusuri unele proprietăți echivalente celor ale unui „virion gigant": - hemadsorbție (echivalentă hemaglutinării) și, - capacitatea de a fuziona cu celule neinfectate pentru a forma, prin fuziunea membranelor, sinciții multinucleate (polikariocite). Această fuziune este echivalentă fuziunii anvelopei virionului cu membrana celulei gazdă la instalarea infecției. Formarea polikariocitelor poate avea loc, de asemenea, sub acțiunea virusurilor inactivate atașate de suprafața celulei ceea ce dovedește că ele conțin o proteină de fuziune funcțională. Acest fenomen este utilizat în scopul fuziunii a două tipuri celulare diferite, în vederea producerii de hibrizi celulari (ca în tehnica hibridoma pentru obținerea de anticorpi monoclonali).

Consecințele infecției virale pentru celulele animale

Virusurile, care au infectat celulele, pot avea diferite efecte asupra acestora, efecte consecutive în general multiplicării virusurilor în celulă sau integrării genomului viral la nivelul unui cromozom al celulei gazdă. Efectele infecțiilor virale asupra celulei animale, pe termen scurt și pe termen lung, sunt bine documentate. Efectele citopatice (CPE) sunt definite ca prejudicii induse de virus celulei, care alterează aspectul său microscopic. Celulele individuale își pot pierde orientarea, suferă modificări mari în formă, dimensiune sau modificări intracelulare. Exemplul obișnuit îl reprezintă **corpii de incluzie**: masele compacte de virus sau organite celulare deteriorate, localizate în nucleu sau citoplasmă. Examinarea celulelor sau țesuturilor pentru efecte citopatice constituie o parte importantă a diagnosticului infecțiilor virale. Tabelul 12 sumarizează unele dintre efectele citopatice îndeosebi asociate cu virusuri specifice.

Tabelul nr. 12

Modificări citopatice în celule animale infectate cu virusuri (selectate)

Virus	Răspunsul celulei animale
Virusul variolei	Celule rotunjite; apar incluzii în citoplasmă.
Herpes simplex	Celulele devin gigante, cu nuclei multipli; incluzii nucleare.
Adenovirus	Agregarea celulelor; incluzii nucleare.
Poliovirus	Liza celulară; absenţa incluziilor.
Togavirus	Liza celulară; absenţa incluziilor.
Reovirus	Celula mărită; vacuole şi incluzii în citoplasmă.
Influenza virus	Celule rotunjite; absenţa incluziilor.
Virusul rabiei	Nu se modifică forma celulei; incluzii citoplasmatice (corpi Bebeş - Negri).
HIV	Celule gigant cu numeroşi nuclei (multinucleate).

Unele infecţii virale au ca rezultat modificări în funcţiile celulei gazdă, care pot să nu fie vizibile în celulele infectate. De exemplu, dacă un virus modifică nivelul de producere al unui hormon, atunci celulele ţintă pentru hormonul respectiv nu vor funcţiona adecvat.

Datorită alterărilor acumulate, ca urmare a infecţiei virale, majoritatea celulelor gazdă sunt omorâte. Infecţia care are ca rezultat distrugerea celulei gazdă se numeşte **infecţie litică** (Fig. 86). Totuşi unele celule gazdă îşi menţin faţă de virus relaţia de purtător, în care celula găzduieşte virusul şi nu este distrusă de el. Aceste aşa numite **infecţii persistente** (Fig. 86) pot dura de la câteva săptămâni la perioade îndelungate (întreaga viaţă, în unele cazuri). În cazul virusurilor cu anvelopă, eliberarea virionilor, care are loc prin înmugurire, poate fi lentă şi celula poate să nu fie lizată. Celula poate supravieţui şi continuă să producă virus o lungă perioadă de timp.

În alte cazuri, virusurile persistente rămân într-o stare latentă cronică, periodic devenind reactivate. Astfel, **infecţia latentă** a gazdei se caracterizează prin existenţa unei întârzieri între momentul infecţiei cu virus şi apariţia simptomelor. În această categorie intră infecţiile cu herpes simplex virus şi herpes zoster virus. Leziunile herpetice reapar sporadic ca urmare a ieşirii virusului din latenţă sub influenţa unor stimului diverşi. Stadiul latent în infecţia virală a unei celule animale nu este în general datorat integrării genomului viral în genomul celulei animale, ca în cazul infecţiilor latente prin bacteriofagi temperaţi.

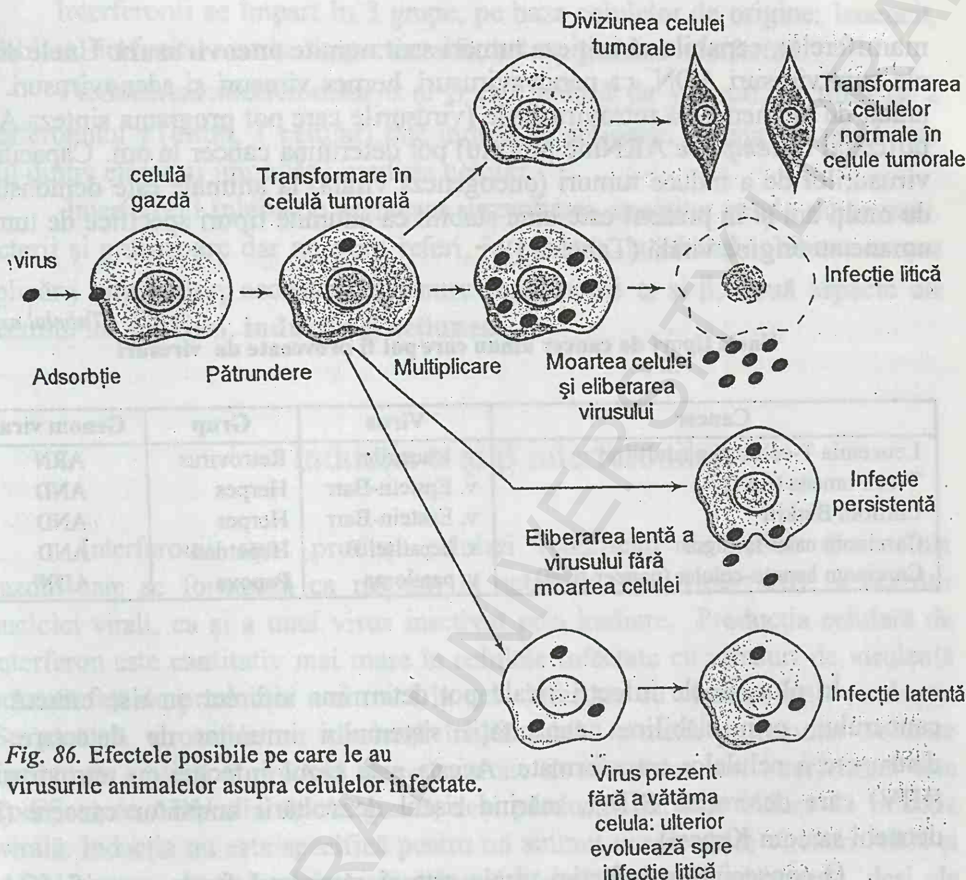


Fig. 86. Efectele posibile pe care le au virusurile animalelor asupra celulelor infectate.

Un număr de virusuri ale animalelor au potențialul de a modifica o celulă normală într-una canceroasă sau tumorală. Aceste virusuri sunt numite oncogene și efectul lor asupra celulei este numit **transformare**. O trăsătură alarmantă a acestor virusuri este că acidul lor nucleic este consolidat (integrat) în ADN al gazdei sub forma de provirus. Modificările dobândite de celulele transformate includ o rată crescută a creșterii și capacitatea de a se divide pe o perioadă nedefinită, spre deosebire de celulele normale.

În cursul procesului de transformare creșterea și diviziunea celulelor devin astfel necontrolate. Creșterea și diviziunea celulelor normale se află sub controlul a cel puțin două tipuri de gene (proto oncogene și gene supresor a tumorii) ale căror modifcări conduc la scăparea de sub control a proceselor și deci la cancer. Anumite virusuri, realizând modificarea genetică (ca și anumiți factori chimic sau fizici) duc la inițierea formării tumorii. Virusurile

mamiferelor, capabile să inițieze tumori sunt numite **oncovirusuri**. Unele dintre ele sunt virusuri ADN, ca papovavirusuri, herpes virusuri și adenovirusuri. S-a arătat de asemenea că retrovirusurile (virusurile care pot programa sinteza ADN utilizând ca *template* ARNmc propriu) pot determina cancer la om. Capacitatea virusurilor de a induce tumori (oncogeneză virală) la animale este demonstrată de mulți ani și în prezent este bine stabilit că anumite tipuri specifice de tumori umane au origine virală (Tabel. 13).

Tabelul nr. 13

Unele tipuri de cancer uman care pot fi provocate de virusuri

Cancer	Virus	Grup	Genom viral
Leucemia T-celulară a adulților	v. leucemiei	Retrovirus	ARN
T-cel. umane (tip I)	v. Epstein-Barr	Herpes	AND
Limfom Burkitt	v. Epstein-Barr	Herpes	AND
Carcinom naso-faringian	v. hepatitei B	Hepatdna	AND
Carcinom hepato-celular (cancer ficat)	v. papiloma	Papova	ADN

În plus, unele infecții virale pot determina indirect un risc crescut al cancerului, prin slăbilirea capacității sistemului imunitar de detectare și distrugere a celulelor transformate. Acesta este cazul infecției cu retrovirusul (HIV) care determină SIDA, mărind riscul dezvoltării anumitor cancere (în deosebi sarcom Kaposi).

O consecință a infecției virale este și răspunsul foarte semnificativ a numeroase celule animale de a produce substanțe cunoscute sub denumirea de **interferoni**. Descoperirea inițială a interferonului (de către A. Isaacs și J. Lindemann, în 1957) a avut loc în cursul studiilor asupra interferenței virale, fenomen prin care infecția cu un virus interferă cu infecția ulterioară cu alt virus, de unde numele de interferon.

Interferonii sunt în prezent definiți ca substanțe antivirale produse de numeroase celule umane și animale ca răspuns la infecția cu anumite virusuri (sau după expunerea la alți inductori). Aceste substanțe sunt reprezentate de un grup heterogen de glicoproteine (g.m. = 17.000 - 40.000 Da) care împiedică multiplicarea virală în celulele normale, având în plus și alte efecte biologice (antitumorale, imunomodulatoare). Multiplicarea virusurilor este inhibată prin **blocarea traducerii proteinelor virale**.

Interferonii se împart în 3 grupe, pe baza celulelor de origine: leucocit, fibroblast, limfocit - numite respectiv: alfa, beta și gamma interferoni.

Producerea interferonilor α și β este indusă de virusuri, în timp ce a interferonului γ (imun, T celular) este indusă de antigene. Acesta din urmă este unul dintre efectorii imunității mediate celular.

Interferonii inhibă de asemenea dezvoltarea anumitor celule canceroase, bacterii și protozoare dar ne vom referi, în context, la efectul inhibitor asupra replicării virusurilor, accentuând, pentru interferonii α și β, două aspecte ale efectului lor antiviral: **inducția și acțiunea**.

Inducția α și β interferonilor.

Interferonii sunt produși celulari (codificați de ADN din celula gazdă) care se formează ca răspuns la acțiunea unui virus activ, a acizilor nucleici virali, ca și a unui virus inactivat prin iradiere. Producția celulară de interferon este cantitativ mai mare în celulele infectate cu virusuri de virulență scăzută față de producția mai mică în cele infectate cu virusuri înalt virulente. Se pare că virusurile cu virulență înaltă inhibă sinteza proteinelor celulare înainte de a putea fi produsă orice cantitate de interferon, ori interferonul este codificat de ADN din celula gazdă, deși producția lui este indusă de infecția virală. Inducția nu este specifică pentru un anumit virus; multe virusuri ARN și ADN umane, ale animalelor, plantelor și bacteriilor sunt competente, deși ele diferă ca eficiență.

În afară de virusuri, inductori puternici de interferon sunt acizii ribonucleici dublu catenari. Constatarea că ARNdc este un inductor bun și nu ADN sau ARNmc a condus la ipoteza că ARNdc este sintetizat ca etapă a ciclului de replicare a tuturor virusurilor inductoare. Deoarece ARNdc nu există în celule neinfectate, dar există ca formă replicativă în celulele infectate cu virus ARN, ARNdc poate servi ca semnal al infecției virale în celula animală, urmat de punerea în acțiune a sistemului de producere a interferonului.

Există și inductori slabi, de interes microbiologic, reprezentați de o varietate de bacterii intracelulare și de protozoare ca și de anumite substanțe bacteriene cum ar fi endotoxina.

Numărul mare de inductori demonstrează că inducția interferonilor nu este specifică (este **nespecifică**). De asemenea, **acțiunea** lor inhibitoare **nu este specifică** pentru un virus particular. Cu toate acestea, interferonii sunt tipic **specifici** în ce privește **specia gazdă** în care acționează. Astfel, interferonii produși de celulele umane sunt activi în celulele umane, dar sunt mult mai puțin eficienți în celulele altor specii. Interferonul produs de un membru al unei specii recunoaște receptori specifici numai pe celulele de aceeași specie. Deci interferonii nu sunt specifici de virus dar specifici de gazdă. De aceea, interferonul produs de un tip de organism animal (de exemplu pui de găină) ca răspuns la virusul influenza inhibă multiplicarea altor virusuri la aceeași specie, dar nu are efect asupra multiplicării virusului influenza la alte specii animale. Este clar, prin urmare, că pentru terapie umană nu pot fi utilizate ca sursă de interferoni speciile animale.

Acțiunea α și β interferonilor

Interferonii nu au efect în celulele neinfectate. Ei inhibă replicarea intracelulară a unei largi varietăți de virusuri, având un efect nesemnificativ asupra metabolismului celulelor normale: manifestă deci, un grad remarcabil de **inhibiție selectivă**.

Acțiunea interferonilor se manifestă prin inducția sintezei a 3 proteine (= proteine antivirale) care **inhibă traducerea ARNm viral.** fără a afecta traducerea ARNm celular.

Cele 3 proteine sunt: (1) 2, 5-oligonucleotid sintetaza care sintetizează un adenin trinucleotid [2, 5 - oligo(A)]; (2) o endonuclează, care este activată de 2, 5 - oligo(A) și care degradează ARNm viral dar nu celular și (3) o proteinkinază care fosforilează un factor de inițiere (eIF-2) pentru sinteza proteinei, prin aceasta inactivând-o. Este inhibată astfel sinteza de proteine specific virale. Interferonii nu au efect asupra particulelor virale extracelulare, însă protejează celulele vecine, neinfectate, de infecția virală.

Deoarece producerea de interferoni are loc în câteva ore de la inițierea replicării virale, ei pot acționa în faza timpurie a bolilor virale limitând răspândirea virusului.

Utilizarea interferonilor ca agenţi terapeutici (cu acţiune antivirală şi anticanceroasă) s-a lovit mult timp de dificultatea şi costul producerii de cantităţi mari, dar tehnicile de inginerie genetică (prin clonarea genelor care codifică interferoni umani) fac posibilă în prezent producerea de interferoni pe scară comercială şi testarea eficienţei clinice.

VIROIZII ŞI PRIONII

Există un număr mic de entităţi cunoscute, ale căror proprietăţi sunt în dezacord cu definiţia virusurilor, ca elemente genetice care modifică procesul celular normal supunându-l propriei replicări şi care au o formă extracelulară. Ca atare, aceste entităţi nu sunt considerate, în prezent, virusuri, deşi par strâns înrudite cu virusurile. Din categoria entităţilor la care ne referim şi care reprezitnă o categorie aparte de agenţi infecţioşi subvirali, fac parte şi viroizii şi prionii.

Viroizii sunt molecule mici de ARNmc circular care nu codifică proteine şi sunt total dependente, pentru replicare, de enzimele codificate de celula gazdă. Izolaţi în 1971 de T.O. Diener, viroizii au fost consideraţi virusuri, ulterior stabilindu-se conceptul de viroid. Spre deosebire de virusuri, la viroizi forma lor extracelulară este aceeaşi cu forma intracelulară şi nu au înveliş proteic (capsidă). Viroizii sunt cei mai mici agenţi patogeni cunoscuţi (de la viroidul *cadang cadang* al cocotierului care are 246 nucleotide, la viroidul *citrus exocorticus* din 375 nucleotide). Ei reprezintă o categorie specială de agenţi patogeni subvirali, exclusiv la plante, determinând boli grave la importante plante de cultură: tuberculii fusiformi de la acrtof; nanismul hameiului; *cadang - cadang* la cocotieri, *citrus exocorticus* la citrice; nanismul şi marmorarea clorotică la crizanteme şi altele. Interesant este că molecula de ARN infectantă nu conţine gene pentru codificarea proteinelor şi deci viroidul este total dependent, pentru replicarea sa, de funcţiile gazdei.

Deşi ARN viroidal este de formă circulară monocatenară. există o structură secundară, posibilă, care este asemănătoare unei molecule dublu catenare, cu capete închise (Fig. 87). Formarea acesteia din urmă are la bază faptul că în molecula circulară există secvenţe complementare, care corespund regiunilor dublu-catenare şi diferite alte secvenţe care formează bucle monocatenare. Molecula viroidală pare a fi replicată în nucleul celulei gazdă şi,

structura sa care într-un fel mimează strucutra ADN, îi permite să fie replicată de ARN-polimeraza gazdei. Astfel, informația genetică viroidală „înșeală" ARN polimeraza gazdei și se comportă ca o moleculă similară ADN (*ADN-like*).

Existența viroizilor ridică mai multe probleme interesante și intrigante în legătură cu boala pe care o produc. Localizarea viroizilor, în principal, în nucleul celulei gazdă împreună cu capacitatea lor de a servi ca matriță ARNm sugerează faptul că simptomele de boală pot rezulta din interferența viroidului cu mecanismele genetice și funcțiile metabolice ale gazdei. O asemenea interferență poate determina producerea unor proteine „greșite".

Viroizii sunt considerați de unii autori introni circularizați (proveniți în cursul transcrierii genetice în celula eucariotă) care scapă procesului de degradare în celula respectivă.

În mod cert, viroizii sunt sisteme genetice independente, cu proprietăți determinate de secvența nucleotidică a acizilor ribonucleici respectivi.





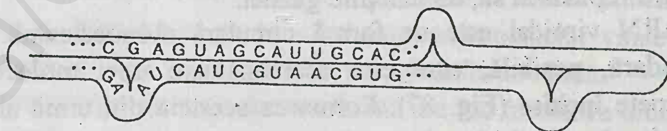


Fig. 87. Structura viroizilor, cu indicarea modalității prin care ARN circular monocatenar poate forma o structură aparent dublu catenată prin împerecherea bazelor intracatenare.

Prionii reprezintă extrema cealaltă față de viroizi, luând în considerație parametrii care definesc virusurile. Ei au o formă extracelulară distinctă, dar forma extracelulară este reprezentată în întregime de proteină (fără acidul nucleic care codifică proteina). Cu toate acestea particula de proteină prionică este infecțioasă și sunt cunoscuți diferiți prioni care produc o varietate de boli la animale și om. Termenul de prion a fost introdus de Prusiner S.B., care în 1980 propune ipoteza prionului, pentru a distinge, de viroizi și virusuri, particulele infecțiose proteice (*proteinaceous infectious*) care determină un grup de boli neurodegenerative. Bolile neurodegenerative determinate de prioni sunt în prezent clasificate împreună, deoarece etiologia și patogeneza lor implică modificarea unei proteine celulare normale numită de Prusiner PrP (proteină prionică). Aceste boli se manifestă ca boli infecțioase, ereditare și sporadice. Termenii utilizați anterior pentru bolile prionice includ: encefalopatii transmisibile, encefalopatii spongiforme și boli cu virusuri lente. Bolile prionice reprezentative sunt: scrapia (tramblanta) oilor, encefalopatia spongiformă bovină (B.S.E. sau boala „vacii nebune"), iar la om: kuru (în regiunea Fore a insulelor Noua Guinee), boala Creutzfeld - Jakob (C.J.D.), sindromul Gertsmann - Sträussler - Sheineker și insomnia familială fatală. În 1996, Anglia a furnizat informația după care prionul ce determină B.S.E. la bovine poate infecta oameni, rezultând o variantă a C.J.D.

Pe lângă boala cu urmări grave, infecția prionică are ca rezultat producerea mai multor copii ale proteinei prionice.

Această proteină trebuie să fie codificată de acid nucleic, altfel, existența prionilor ar pune sub semnul întrebării modelul central al fluxului de informație genetică. Recent, s-a descoperit cu certitudine că celula gazdă conține o genă, pe unul din cromozomii săi (gena PrP), care codifică o proteină foarte similară cu proteina prionică (PrP). Rezultatele cercetărilor intensive realizate în ultimii ani au demonstrat că PrP prezintă două isoforme care se disting prin conformație: (1) produsul normal al genei PrP numit PrP^{c} 33-35 kDa și (2) PrP^{sc} 27-30 kDa, pentru agentul (PrP) scrapiei, produs responsabil de boală. (Tabel 14). Pentru agentul scrapiei s-a demonstrat că este alcătuit exclusiv

dintr-o proteină care adoptă o conformaţie anormală. Proteina gazdei este produsă normal şi se găseşte predominant în neuroni. Prionul care pătrunde în celulă modifică această proteină a gazdei fie în cursul, fie după sinteză. Structura şi organizarea genei PrP a sugerat că PrP^{sc} este derivată din PrP^{c} sau un precursor, printr-un proces post-translaţional. Mecanismul molecular al formării rămâne de elucidat, dar studiile de chimie şi fizică au arătat diferenţa profundă a conformaţiilor PrP^{c} şi PrP^{sc}. În consecinţă, prionii nu supun enzimele gazdei pentru propria replicare, ci determină, într-un anume fel, o genă normală a gazdei să producă mai multe copii ale propriei proteine patogene.

Tabelul nr. 14

Glosar de terminologie pentru prioni

Termen	Descriere
Prion	O mică particulă infecţioasă proteică, ce rezistă inactivării prin procedee care afectează acizii nucleici. Prionii sunt compuşi în mare, dar nu în totalitate din molecule de PrP^{sc}.
PrP^{Sc}	Isoforma scrapie a proteinei prionice. Această proteină este singura macromoleculă identificabilă în preparatele purificate de prioni ai scrapiei.
PrP^{c}	Isoforma celulară a proteinei prionice.
PrP27-30	Digestia PrP^{Sc} cu proteinază K generează prin hidroliză PrP27-30.
PRNP	Gena PrP localizată în cromozomul 20 uman.
Prn-p	Gena PrP localizată pe cromozomul 2 al şoarecelui
Pid-1	Gena de pe cromozomul 17 de şoarece care pare a influenţa experimental timpii de incubaţie ai scrapiei şi CJD.
Prn-i	Gena de pe cromozomul 2 de şoarece care controlează experimental timpii de incubaţie ai scrapiei şi CJD. *Prn-i* şi *Prn-p* formează complexul de gene prionice (*Prn*).
Sinc	Gena de la şoarece, care controlează experimental timpii de incubaţie ai scrapiei. Acest locus genetic este probabil acelaşi cu *Prn-i*.
PrP amiloid	Plaja amiloidă compusă din PrP în creierul animalelor şi oamenilor cu encefalopatie spongiformă.
Prion-bastonaş	Agregat de prioni compus în mare, dar nu în întregime din molecule PrP 27-30. Format prin extracţie cu detergent şi proteoliză limitată a PrP^{Sc}.

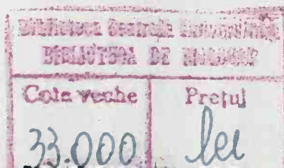
Particula infecţioasă denumită prion este deci o proteină infecţioasă, o formă alterată a unei proteine codificată cromzomal, care şi-a pierdut funcţia sa normală, dar a dobândit capacitatea de a converti forma normală a proteinei în aceeaşi formă (prion) alterată.

Cunoaşterea **viroizilor şi prionilor** prezintă interes din mai multe motive:

- extind definiţia dată virusurilor, faţă de care sunt caracterizaţi;
- demonstrează existenţa atât a unor modalităţi neaşteptate prin care elementele genetice se pot replica, cât şi a unor modalităţi neaşteptate prin care pot supune celulele gazdă;
- determină boli grave care la om au un caracter unic prin aceea că sunt atât boli genetice (ereditare), cât şi infecţioase. PrP normală suferă rareori modificarea la prion (odată la 10^6 oameni) şi proteina alterată este infecţioasă, dar mutaţiile la nivelul genei care codifică PrP pot face modificarea mult mai posibilă, ceea ce explică formele ereditare ale bolii. Până în prezent au fost găsite 19 mutaţii diferite ale genei PrP umane, care determină boli prionice ereditare. Deoarece în prezent este posibilă identificarea oamenilor cu risc de boli prionice ereditare (cu decenii înainte ca disfuncţia neurologică să fie evidentă) este imperativă dezvoltarea unei terapii eficiente. Cunoştinţele acumulate din studiul bolilor prionice pot furniza, de asemenea, o strategie efectivă pentru definirea etiologiei şi detalierea patogenezei moleculare a maladiilor mai comune neurodegenerative ca boala Alzheimer, boala Parkinson şi scleroza amiotrofică laterală.

Cercetări recente relatează posibila existenţă a prionilor la levuri (*Saccharomyces cerevisiae*), corespunzând unor elemente non-mendeliene, [URE3] şi [PSI], care ar fi analoge agentului scrapiei de la mamifere. S-a arătat că prin mărirea sau micşorarea nivelului proteinei de şoc termic 104 (Hsp 104p) este posibilă eliminarea [PSI], ceea ce sugerează o cale posibilă de tratare a bolilor prionice. În contextul sugerat al posibilităţii existenţei unui număr mare de boli bazate pe mecanismul prionic, importanţa datelor noi obţinute pe drojdii este deosebită.

Biologia prionilor, cu rădăcini în virologie, neurologie şi neuropatologie, a devenit mai recent corelată cu disciplinele de biologie celulară şi moleculară, ca şi de chimie a proteinelor. Cunoaşterea exactă a modalităţilor de multiplicare a prionilor şi de producere a bolii vor deschide cu siguranţă noi perspective în biochimie şi genetică.



Particula infecţioasă denumită prion este deci o proteină infecţioasă, o formă alterată a unei proteine codificate cromozomial, care şi-a pierdut funcţia sa normală, posedând însă capacitatea de a converti forma normală a proteinei în această formă (prion) alterată.

Cunoaşterea naturii şi a prionilor prezintă interes din mai multe motive:

- [illegible] definirea [illegible], faţă de cele prin care [illegible];
- demonstrează existenţa unei alte [illegible] a unor modificări [illegible] elementele genetice nu sunt necesare, ci şi a unor modificări [illegible] pot suprime celulele gazdă;
- determină boli [illegible] care le [illegible] un caracter unic prin aceea că sunt atât boli genetice (ereditare) cât şi infecţioase. PrP normală suferă [illegible] modificarea la prion (odată la [illegible]) şi proteina alterată este infecţioasă, dar mutaţiile la nivelul genei care codifică PrP pot face modificarea mult mai posibilă, ceea ce explică formele ereditare ale bolii. Până în prezent au fost găsite 19 mutaţii diferite ale genei PrP umane, care determină boli prionice ereditare. Deoarece în prezent este posibilă identificarea oamenilor cu risc de boli prionice ereditare [illegible] ca simptomatologia neurologică să fie evidentă) este importantă dezvoltarea unei terapii eficiente. Cunoştinţele acumulate din studiul bolilor prionice pot furniza, de asemenea, o strategie eficientă pentru a înfrunta etiologia şi [illegible] patogenezei moleculare a maladiilor mai comune neurodegenerative ca boala Alzheimer, boala Parkinson şi scleroza amiotrofică laterală.

Cercetări recente relatează prezenţa prionilor la levuri (Saccharomyces cerevisiae), corespunzând unor elemente non-mendeliene, [URE3] şi [PSI], care ar fi analoge [illegible]. S-a arătat că prin mărirea sau micşorarea nivelului proteinei de şoc termic 104 (Hsp 104) este posibilă eliminarea [PSI], ceea ce sugerează o nouă posibilitate de tratare a bolilor prionice la [illegible] şi posibilitatea existenţei unui număr mare de boli bazate pe mecanismul prionic, importanţa [illegible] pe deplin este deschisă.

Biologia prionilor, cu impact în virusologie, neurologie şi neuropatologie, a devenit mai recent cuplată cu disciplinele de biologie celulară şi moleculară, ca şi de cele a proteinelor. Cunoaşterea [illegible] de multiplicare a prionilor şi de producere a bolii vor deschide cu siguranţă noi perspective în biomedicină şi genetică.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D., 1994, *Molecular biology of the cell*, 3rd ed., Garland Publishing Inc., New York, p.274 - 284.

BARINGA, M.Y., 1990, *Introns Pop up New Places - What Does It Mean?*, Science, **250** : 1512.

BARNS, S.M., FUNDYGA, R.E., JEFFRIES, M.W., PACE, R.N., 1994, *Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **91**: 1609 -1613.

BEVERIDGE, T.J., 1981, *Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial wall*, Intl. Rev. Cytol., **72**: 229 - 317.

BEVERIDGE, T.J., 1988, *The bacterial surface: general considerations towards design and function*, Can. J. Microbiol., **34**: 363 - 372.

BEVERIDGE, T.J. and GRAHAM, L.L., 1991, *Surface layers of bacteria*, Microbiol. Rev., **55**: 684 - 705.

BEVERIDGE, T.J., SHULTZE-LAM, S., 1996, *The response of selected members of the archaea to the Gram stain*, Microbiology, **142** : 2887 - 2895.

BÎLBÎIE, V., POZSGI, N. (sub red.), 1984; 1985, *Bacteriologie medicală,* vol. I și vol. II, Edit. Medicală, București.

BLACK, J.G., 1996, *Microbiology: principles and applications*, Third Edition, Prentice Hall, New Jersey.

BRENNER, D.J., 1991, *Taxonomy, Classification and Nomenclature of Bacteria*, In: *Manual of Clinical Microbiology* (Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., eds.), Fifth Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 209 - 216.

BROCK, T.D., 1974, *Biology of microorganisms*, Prentice Hall, Inc., Second Edition, Englewood Cliffs, New Jersey.

BROCK, T.D., 1975, *Milestones in Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.

BROCK, T.D., BROCK, K.M., 1978, *Basic Microbiology with applications*, Second Edition, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., 1988, *Biology of Microorganisms*, Fifth Edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., 1991, *Biology of Microorganisms*, Sixth Edition, Prentice Hall International, Inc.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J., 1994 *Biology of Microorganisms*, Seventh Edition, Prentice H., International, Inc.

BUIUC, D., 1992, *Microbiologie medicală*, Edit. Didactică și Pedagogică, București.

BUSSARD, A., 1993, *La découverte des prions va-t-elle révolutionner la biologie moléculaire?*, Médecine/Sciences, 9: 1409 - 1411.

CAJAL, N., (sub redacþia), 1990, *Tratat de Virusologie medicală*, vol. I, Edit. Medicală, București.

COLLIER, L.H., TIMBURY, M.C. (eds)., 1990, *Virology*, vol. 4 din *TOPLEY AND WILSON'S PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNITY*, Eighth Edition, Edward Arnwold, Hodder & Stonghton Publishers.

CREAGER, J.G., BLACK, J.G., DAVISON, V.E., 1990, *Microbiology: Principles and Applications*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, S.H., With 29 Additional Contributors, 1990, *Microbiology*, Fourth Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia.

DIMACHE, Gh., RADU, V., CERNESCU, C., 1984, *Microbiologie și igienă*, Edit. Didactică și Pedagogică, București.

DIMACHE, Gh., PANAITESCU, D., 1994, *Microbiologie și Parazitologie medicală*, Edit. Uranus, București.

DOELLE, H.W., HEDEN, C.G., 1986, *Applied Microbiology*, (*Trends in scientific research*: 2), Dordrecht; Boston; Lancaster, D. Reidel Publishing Company.

DOERFLER, W., BÕHM, P. (Eds.), 1993, *Virus strategies*, Weinheim - New York - Basel - Cambridge - Tokyo.
DRIKS, A. and De ROSIER, 1991, *Additional strucutres associated with bacterial flagellar basal body*, mol. Biol., **211**: 669 - 772.
DRLICA, K., PRUSS, G.J., BURGER, R.M., FRANCO, R.J., HSIEH, L.S., BERGER, B.A., 1992, *Roles of DNA topoisomerases in bacterial chromosome structure and function,* p. 195 - 204. In: K. DRLICA & M. RILEY (eds.) *The bacterial Chromosome*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
EBERSOLD, H.R., CORDIER, J.L., LUTHY, P., 1981, *Bacterial mezosomes*, Arch. Microbiol., **130**: 19 - 22.
EIGEN, M., 1993, *Viral Quasispecies*, Scientific American, July: 42 - 49.
ERRINGTON, J., 1993, *Bacillus subtilis sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis.* Microbiol. Rev., **57**: 1 - 33.
FERDOWS, M.S., BARBOUR, A.G., 1989, *Megabase-sized linear DNA in the bacterium Borrelia burgdorferi the Lime disease agent*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **86**: 5969 - 5973.
FROMENT, J., 1996, *Vache folle: prion ou virus?* La Recherche, **287**: 26 - 27.
FUERST, R., 1978, *Frobisher and Fuerst's MICROBIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE*, Fourteenth Edition, W.B. Saunders Company.
GÓMEZ-EICHELMANN, M.C., CAMACHO-CARRANZA, R., 1995, *El nucleoide bacteriano*, Rev. Lat.-Amer. Microbiol., **37**: 281 - 190.
GREENWOOD, D., SLACK, R., FORREST, J., 1994, *Medical Microbiology*, 14th ed., E.L.B.S.
GUERRERO-BARRERA, A.L., GARCIA-CUÉLLAR, C.M., VILLALBA, J.D., SEGURO-NIETO, M., GÓMEZ-LOJERO, C., REYES, M.E., HERNÁNDEZ, J.M., GARCIA, R.M., GARZA, M., 1996, *Actin - related proteins in Anabaena spp. and Escerichia coli*, Microbiology, **142**: 1133 - 1140.
HARRINGTON, L.C. and ROGERSON, A.C., 1990, *The F pilus of E. coli appears to support stable DNA transfer in the absence of wall-to-wall contact between cells*, J. Bacteriol., **172**: 7263 - 7264.
HAWKER, L.E., LINTON, A.H., 1971, *Micro-organisms; function, form and environment*, Edward Arnold (Publishers) Ltd.

HERLEA, V., 1984, *1. Definirea și delimitarea drojdiilor ca grup de microorganisme. Conceptul de levuri sau drojdii. 2. Taxonomie. 3. Drojdii în substraturi naturale și produse industriale. Considerapii ecologice.* In: *Drojdiile. Taxonomie. Ecologie. Citologie. Genetică.* (I. Anghel, V. Herlea, N. Toma), Edit. Academiei Române, București: 10 - 86.

HERLEA, V., 1986, *Introducere în Imunobiologie - domeniu al Biologiei moderne.* Probleme actuale de Biologie, M.E.I.: 7 - 33.

HERLEA, V., 1991, *Caracterizarea și identificarea drojdiilor.* In: *Biologia și tehnologia drojdiilor,* (I. Anghel, V. Herlea, T. Vassu, V. Dan, B. Segal, I. Oancea, P. Berzescu), vol. II, Edit. Tehnică, București, 11 - 101.

HERLEA, V., LAZĂR, V., CANJA, D., 1994, *Yeast as a Model Eukaryotic Cell - Biotechnological Implications,* Proceeding of the 8th National Symposium of Industrial microbiology and Biotechnology (Ed. ANGHEL, I.), Edit. Univ. Buc., 92 - 103.

HERLEA, V., 1995, *Regnul PROKARYOTAE.* In: *Diversitatea lumii vii. Determinatorul ilustrat al florei și faunei României,* (sub red. S.P. Godeanu), Vol. 1; 30 - 40, Ed. Bucura Mond, București.

HOMMA, M., OOTA, H., KOJIMA, S., KAWAGISHI, I., IMAE, Y., 1996, *Chemotactic responses to an attractant and a repellent by the polar and lateral flagellar systems of Vibrio alginolyticus,* Microbiology, **142**: 2777 - 2783.

HUDSON, B.K., SHERWOOD, L., 1997, *Explorations in Microbiology,* Prentice Hall, New Jersey.

HURAUX, J.M., NICOLAS, J.C., AGUT, H., 1985, *Virologie,* Ed. Flamarion, Medicine Sciences.

INGLEDOW, J., POOLE, R.K., 1984, *The Respiratory Chains of Escherichia coli,* Microbiol. Review, 48: 222 - 271.

JOHNSON, A.G., ZIEGLER, R.J., LUKASEWYCZ, O.A., HAWLEY, L.B., 1996, *Microbiology and Immunology,* 3rd edition, Williams & Wilkins.

KANDLER, O., 1992, *Where next with the archaebacteria?,* Biochem. Soc. Symp., **58**: 195 - 207.

KRAWIEC, S. and RILEY, M., 1990, *Organization of bacterial chromosome,* Microbiol. Rev., **54**: 502 - 539.

KRIEG, N.R., HOLT, J.G., (Ed.), 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,* vol. 1, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

LAURENT, M., 1996, *Les maladies á prions: L' hypothese de la protéine seule et ses conséquences dynamiques*, Médicine/Sciences, **12**: 774 - 785.

LECLERC, H., IZARD, D., HUSSON, M.O., 1983, *Microbiologie générale, 2-eme ed.,* Paris: Doin.

LEDERBERG, J., 1992, *Encyclopedia of Microbiology,* Vol. 1. A - C, vol. 2, D - L, vol. 3. M - R, vol. 4. S - Z, Index Academic Press, Inc.

LEIVE, L. (Ed.), 1985, *Microbiology- 1985*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

LENNETTE, E.H. (Ed.), 1980, *Manual of clinical microbiology*, American Society of Microbiology, Washington, D.C.

LEVINSON, W.E., JAWETZ, E., 1994, *Medical Microbiology & Immunology*, Examination & Board Review, Third Edition, Prentice Hall International Inc.

LINTON, A.H., DICK, M.H. (Eds), 1990, *General Microbiology and Immunity*, Vol. 1 din *TOPLEY AND WILSON'S PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNITY*, Eighth Edition, Edward Arnold, Hodder & Sstonghton Publishers.

MACNAB, R.M. and PARKINSON, J.S., 1991, *Genetics analysis of the bacterial flagellum*, Trends Genet., **7**: 196 - 200.

MADIGAN, M.T., MATTINKO, J.M., PARKER, J., 1997, *Brock Biology of Microorganisms*, Eighth Edition, Prentice Hall, International, Inc.

MANVELIDIS, LAURA, 1996, *Des Séquences virales candidates*, La Recherche, **287**: 26 - 27.

MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., VANCANNEYT, M., SCHLEIFER, K., 1996, *Application of a suite of 16S rRNA - specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga - flavobacter - bacteroides in the natural environment*, Microbiology, **142**: 1097 - 1106.

MĂNESCU, S., 1989, *Microbiologie sanitară,* Edit. Medicală, București.

McKANE, L., KANDEL, L., 1985, *MICROBIOLOGY: Essentials and Applications*, McGraw - Hill, Inc.

MURPHY, F.A., FAUQET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MERTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M. (eds.), 1995, *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of*

Viruses. Sixth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses, Springer - Verlag, Wien, New York.

NESTER, E.W., ROBERTS, C.E., PEARSHALL, N.N., McCARTHY, B.J., 1978, *Microbiology,* Second Edition, Holt, Rinehart and Winston.

OLSON, A., JONSSON, A., NORMAK, S., 1989, *Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli,* Nature, **338**: 652 - 654.

PARKER, T., DUERDEN, B.I. (Edit.), 1990, *Systematic Bcteriology.* Vol. 2 din *TOPLEY AND WILSON'S PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNITY*, Eighth Edition, Edward Arnold - Hodder & Stoughton Publishers.

PARKER, G.F., DANIEL, R.A., ERRINGTON, J., 1996, *Timming and genetic regulation of commitment to sporulation in Bacillus subtilis,* Microbiology, **142**: 3445 - 3452.

PELCZAR, M.J., REID, R.D., CHAN, E.C.S., 1977, *Microbiology*, Fourth Edition, McGraw - Hill, Inc.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., 1982, *Eléments de microbiologie*, Montreal.

PILET, C., BOURDON, J.L., TOMA, B., MARCHAL, N., BALBASTRE, C., 1981, *Bacteriologie médicale et vetérinaire,* 2-e éd., Paris.

PRIEST, F., AUSTIN, B., 1994, *Modern Bacterial Taxonomy*, Chapmann & Hall.

PRUSINER, S.B., 1991, *Molecular biology of prion diseases,* Science, **252**: 1515 - 1522.

PRUSINER, S.B., 1995, *The prion disease*, Scientific American, 1: 17 - 21.

PRUSINER, S.B., 1996, *Molecular biology and pathogenesis of prion disease,* Elsevier Science Ltd., TIB, **21**: 482 - 487.

PTASHNE, M., 1989, *How Gene Activators Work,* **260**: 41 - 47.

REYSENBACH, A.L., WICKHAM, G.S., PACE, N.R., 1994, *Phylogenetic Analys of the Hyperthermophilic Pink Filament Community in Octopus Spring, Yellowstone National Park,* Appl. Environ. Microbiol., **60**: 2113 - 2119.

RHODES, A., FLETCHER, D.L., 1966, *Principles of Industrial Microbiology,* Pergamon Press Ltd.

SCHLESSINGER, D. (Ed.), 1977, *Microbiology - 1977*, American Society of Microbiology, Washington, D.C.

SCHUSTER, S.C. and BAEURELIN, E., 1992, *Location of the basal disc and a ring-like cytoplasmatic structure, two additional structures of the flagellar apparatus of Wolinella succinogenes*, J. Bacteriol., **174**: 263- 268.

SCHÛTT, C., 1991, *Ecogenetics: A new concept of aquatic microbial ecology at genetical level*, Verth. Internat. Verein. Limnol., **24**: 2593 - 2596.

SCRIBAN, R. (coordinnateur), 1993, *Biotechnologie*, 4e edition, Tec.-Doc. - Lavoisier, Paris.

SHAPIRO, L., 1995, *The Bacterial Flagellum: From Genetic Network to Complex Architecture,* Cell, **80**: 525 - 527.

SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L., 1972, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*, Science, **175**: 720 - 731.

SINGLETON, P., SAINSBURY, D., 1981, *INTRODUCTION TO BACTERIA for students in the biological sciences*, John Wiley & Sons Ltd.

SNEATH, P.H.A. (Ed.), 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.

SNEATH, P.H.A. (ed.), 1992, *International code of nomenclature of bacteria*, 1990 Revision, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

SNEATH, P.H.A., 1995, *Taxonomic Note: the Potential of Dead Bacterial Specimens for Systematic Studies,* International Journal of Systematic Bacteriology, **45**: 188 - 189.

STALEY, J.T. (Ed.), 1989, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney.

STANIER, R.J., ADELBERG, E.A., INGRAHAM, J.L., 1983, *General microbiology*, 4th ed., Macmillan Press, ltd., London.

TALARO, K., TALARO, A., 1993, *Foundations in Microbiology*, Wm. C. Brown Communications, Inc.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L., 1986, *Microbiology: an introduction,* The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc.

VIRELLA, G., 1997, *Microbiology and infectious diseases*, 3rd edition, Williams & Wlikins, Baltimore.

WARD, D.M., 1989, *Molecular Probes for Analysis of Microbial Communities*, In: W.G. CHARACKLIS & P.A. WILDERER (eds.), *Structure and Function of Biofilm*, John Wiley & Sons Ltd., p. 145 - 163.

WHITFIELD, C., 1988, *Bacterial extracellular polysaccharides*, Can. J. Microbiol., **34**: 415 - 420.

WICKNER, R.B., 1995, *Prions of yeast and heat-shock protein 104: Coprion and cure*, Trends in Microbiology, **3**: 367 - 369.

WILLIAMS, S.T. (Editor), 1989, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney.

WINKER, S., WOESE, C.R., 1991, *A Definition of the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya in Terms of Small Subunit Ribosomal RNA Characteristics*, System. Appl. Microbiol., **14**: 305 - 310.

WISTREICH, G.A., LECHTMAN, M.D., 1988, *Microbiology*, 5th ed., New York: Macmillan Publishing Company; New York

WOESE, C.R., 1981, *Archaebacteria*, Scientific American, **244**: 1 - 14.

WOESE, C.R., 1982, *Archaebacteria and cellular origins:* An overview, Zbl. Bakt. Hyg., **c3**: 1 - 17.

WOESE, C.R., 1987, *Bacterial evolution*, Microbiol. Rev., **51**: 221 - 271.

WOESE, C.R., KANDLER, O., WHEELIS, M.L., 1990, *Toward a natural system of microorganisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **87**: 4576 - 4579.

WOESE, C.R., ACHENBACH, L., ROUVIERE, P., MANDELCO, L., 1991, *Archaeal Phylogeny: Reexamination of the Phylogenetic Position of Archaeoglobus fulgidus in Light of Certain Composition - induced Artifacts*, System. Appl. Microbiol., **14**: 364 - 371.

WOESE, C.R., 1994, *Microbiology in transition,* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **91**: 1601 - 1603.

XU, Q.M., KATHE, D.S., GOODRICH-BLAIR, H., NIERZWICKI - BAUER, S.A., SHUB, D.A., 1990, *Bacterial Origin of a Chrloroplast Intron: Conserved Self - Splicing Group I Introns in Cyanobacteria*, Science, **250**: 1566 - 1569.

ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală,* Edit. Didact. și Pedagogică, București.

ZARNEA, G., HERLEA, V., 1974, *Poziția microorganismelor în lumea vie. Conceptul de virus, conceptul de bacterie,* În: *Progrese și perspective în Biologie*, M.E.I. București, 19 - 87.

ZARNEA, G., 1983, *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, Edit. Academiei, București.

ZARNEA, G., 1984, *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, Edit. Academiei, București.

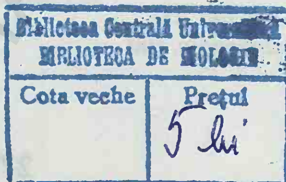
ZARNEA, G., 1986, *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, Edit. Academiei, București.

ZARNEA, G., 1990, *Tratat de microbiologie generală*, vol. IV, Edit. Academiei, București.

ZARNEA, G., 1994, *Tratat de microbiologie generală*, vol. V, Edit. Academiei, București.

INDEX

Tiparul s-a executat sub cda nr. 487/1998, la Tipografia Editurii Universităţii din Bucureşti



FUNDAMENTUM

Microbiologia este una dintre cele mai extinse și complexe științe biologice, deoarece pe lângă studiul istoriei naturale a microorganismelor are în vedere și fiecare aspect al relațiilor microorganism-organism uman, microorganism-mediu, incluzând astfel probleme legate de infecție și boală, terapie medicamentoasă, inginerie genetică sau ecologie.

Lucrarea de față prezintă, într-o formă sintetică, chestiunile legate de structura și arhitectura bacteriilor, metabolismul, creșterea și multiplicarea, genetica - poziția lor în lumea vie etc.

Se adresează studenților în biologie, biochimie, medicină, precum și profesorilor lor

ISBN - 973 - 575 - 276 - x

Lei 33000